

Aus dem Institut für Tierzucht der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie  
(Vorstand: Prof. Dr. E. Wolf)

Angefertigt unter der Leitung von PD.Dr. A. Höflich

# **Funktionale Wachstumsanalyse der Nebennieren IGFBP-2- und GH-transgener Mäuse**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Susanne Schmidt  
aus Wörthsee

München 2005

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig Maximilians Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent:	Priv.-Doz. Dr. A. Höflich
Korreferentin:	Univ.-Prof. Dr. U. Matis

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

Für meine Familie

**“The most obvious differences between different animals are differences in size, but for some reason the zoologists have paid singularly little attention to them. “**

J.B.S. Haldane, On Being the Right Size, 1927

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturteil</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Wachstum</b>	<b>2</b>
<b>2.2</b>	<b>Die Somatomedin Hypothese</b>	<b>3</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Die ursprüngliche Somatomedin Hypothese</b>	<b>3</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Erweiterungen der Somatomedin Hypothese</b>	<b>4</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Wachstumsregulation durch GH</b>	<b>4</b>
<b>2.3</b>	<b>Das IGF System</b>	<b>5</b>
<b>2.3.1</b>	<b>IGF-I und IGF-II</b>	<b>5</b>
2.3.1.1	IGF-I	6
2.3.1.2	IGF-II	6
<b>2.3.2</b>	<b>IGF-I und IGF-II Rezeptor</b>	<b>7</b>
2.3.2.1	IGF-I Rezeptor	7
2.3.2.2	Mannose 6-Phosphat Rezeptor (IGF-II Rezeptor)	7
<b>2.3.3</b>	<b>IGF-Bindungsproteine (IGFBPs)</b>	<b>8</b>
2.3.3.1	Allgemeine Struktur und Funktionsmechanismen	8
2.3.3.2	Spezielle Eigenschaften <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	8
2.3.3.2.1	<i>IGF-abhängige Effekte der IGFBPs</i>	9
2.3.3.2.2	<i>IGF- unabhängige Effekte der IGFBPs</i>	10
2.3.3.3	IGFBP-2	11
2.3.3.3.1	<i>Struktur von IGFBP-2</i>	11
2.3.3.3.2	<i>IGFBP-2 in vitro und in vivo</i>	11
<b>2.4</b>	<b>Signaltransduktion</b>	<b>13</b>
<b>2.4.1</b>	<b>IGF Rezeptor Signaltransduktion</b>	<b>14</b>
2.4.1.1	Der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg (PI3K-Weg)	15
2.4.1.1.1	<i>Insulin Rezeptor Substrat (IRS)</i>	16
2.4.1.1.2	<i>Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN)</i>	16
2.4.1.1.3	<i>Phosphoinositide Dependent Kinase 1 und 2 (PDK1 und PDK2)</i>	17
2.4.1.1.4	<i>PDK abhängige Signalmoleküle</i>	17
<b>2.4.2</b>	<b>Weitere IGF-induzierte wachstumsrelevante Mechanismen</b>	<b>19</b>
2.4.2.1	Mitogen aktivierte Protein Kinase Wege (MAPK-Wege)	20
<b>2.5</b>	<b>Andere wachstumsrelevante Signalwege und Faktoren</b>	<b>20</b>
<b>2.5.1</b>	<b>GHR Signaltransduktion</b>	<b>21</b>

<b>2.6</b>	<b>Die Nebennieren</b>	22
<b>2.6.1</b>	<b>Entwicklung, Anatomie und Funktion der Nebennieren</b>	22
<b>2.6.2</b>	<b>Regulation des Nebennierenwachstums</b>	22
<b>2.6.3</b>	<b>Anatomische Besonderheiten der Nebenniere der Maus</b>	23
<b>2.7</b>	<b>Die Untersuchung der Genexpression auf der Ebene der mRNA</b>	23
<b>2.8</b>	<b>Vorarbeiten und Zielsetzung</b>	37
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	30
<b>3.1</b>	<b>Material</b>	30
<b>3.1.1</b>	<b>Geräte</b>	30
<b>3.1.2</b>	<b>Chemikalien</b>	31
<b>3.1.3</b>	<b>Lösungen und Reagenzien</b>	32
<b>3.1.4</b>	<b>Sonstiges Material</b>	36
<b>3.1.5</b>	<b>Oligonukleotide</b>	37
<b>3.1.6</b>	<b>Antikörper</b>	38
<b>3.1.7</b>	<b>DNA-Molekulargewichtstandards</b>	39
<b>3.1.8</b>	<b>Radiochemikalien</b>	39
<b>3.2</b>	<b>Versuchstiere</b>	39
<b>3.3</b>	<b>Methoden</b>	40
<b>3.3.1</b>	<b>Identifikation der Tiere</b>	40
3.3.1.1	Isolierung von DNA aus Schwanzspitzen	40
3.3.1.2	Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	41
3.3.1.3	Agarosegelelektrophorese	43
3.3.1.3.1	<i>TBE-Agarosegele</i>	44
<b>3.3.2</b>	<b>Nebennierenpräparation</b>	44
3.3.2.1	Gewinnung von nativem Material	44
3.3.2.2	Gewinnung von perfundierten Nebennieren für die Morphometrie	45
<b>3.3.3</b>	<b>Untersuchung des Transkriptoms</b>	46
3.3.3.1	Isolierung von Gesamt-RNA	46
3.3.3.2	Herstellung subtraktiver cDNA-Bibliotheken	47
3.3.3.3	Picken und Kultivierung der cDNA-Klone	47
3.3.3.4	Kolonie-PCR zur Amplifizierung der cDNA Klone	48
3.3.3.5	Herstellung von cDNA-Arrays	49
3.3.3.6	cDNA-Synthese zur Herstellung von Hybridisierungssonden	50
3.3.3.7	Herstellung von Hybridisierungsproben aus ds cDNA	52

3.3.3.8	Hybridisierung	52
3.3.3.9	Auswertung der Signale	53
3.3.3.10	Sequenzierung von cDNA-Klonen	53
3.3.3.11	Datenauswertung und Darstellung der Genexpression	53
<b>3.3.4</b>	<b>Validierung der Ergebnisse mittels quantitativer PCR</b>	54
3.3.4.1	DNase-Verdau	54
3.3.4.2	cDNA-Synthese für quantitative PCR	54
3.3.4.3	Austesten der Primer	55
3.3.4.4	Erstellen einer Standardkurve	56
3.3.4.5	Quantitative PCR	59
3.3.4.6	Datenauswertung und Darstellung der quantitativen PCR	59
<b>3.3.5</b>	<b>Untersuchung von bekannten Signalkaskaden</b>	60
3.3.5.1	Proteinisolierung	60
3.3.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	60
3.3.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	60
3.3.5.4	Herstellung der analytischen Gele	61
3.3.5.5	Beladen des Gels und Elektrophoresebedingungen	62
3.3.5.6	Westernblot	62
3.3.5.7	Coomassie Färbung	64
3.3.5.8	Immunoblot	64
3.3.5.9	Strippen der Membranen	65
3.3.5.10	Datenauswertung und Darstellung der Proteinanalyse	65
<b>3.3.6</b>	<b>Stereologische Untersuchungen der Nebennieren</b>	65
3.3.6.1	Präparation der Nebennieren für stereologische Untersuchungen	65
3.3.6.2	Bestimmung der Anteile der einzelnen Nebennierenfraktionen	66
3.3.6.3	Bestimmung des absoluten Volumens der einzelnen Rindenabschnitte	67
3.3.6.4	Bestimmung der Zellzahl und Zellgröße von Zona fasciculata Zellen	68
3.3.6.5	Datenauswertung und Darstellung der Morphometrie	70
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	71
<b>4.1</b>	<b>Mäusekollektiv</b>	71
<b>4.2</b>	<b>Genotypisierung der Tiere</b>	71
<b>4.3</b>	<b>Untersuchung des Transkriptoms</b>	73
<b>4.3.1</b>	<b>Herstellung von subtraktiven cDNA-Bibliotheken</b>	74
<b>4.3.2</b>	<b>Herstellung von cDNA-Arrays</b>	75

<b>4.3.3</b>	<b>cDNA-Array-Hybridisierung für 11 Wochen alte Tiere</b>	<b>77</b>
<b>4.3.4</b>	<b>cDNA-Array-Hybridisierung für die 38 Tage alten Tiere</b>	<b>80</b>
<b>4.3.5</b>	<b>Untersuchung der Gene mit Hilfe von quantitativer PCR</b>	<b>83</b>
4.3.5.1	Vorbereitung für die Untersuchung	83
4.3.5.2	Standardkurven	83
4.3.5.3	Prp4 in 5 Wochen alten Tieren	85
4.3.5.4	Prp4 in 11 Wochen alten Tieren	86
4.3.5.5	Pex11c in 5 Wochen alten Tieren	86
<b>4.4</b>	<b>Untersuchung der Proteine</b>	<b>87</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Coomassiefärbung</b>	<b>87</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Signaluntersuchung PI3K-Weg</b>	<b>88</b>
4.4.2.1	Analyse der 11 Wochen alten Tiere	88
4.4.2.2	Analyse der 38 Tage alten Tiere	90
<b>4.5</b>	<b>Quantitativ-stereologische Nebennierenbefunde</b>	<b>91</b>
<b>4.5.1</b>	<b>Gewicht der Nebennieren</b>	<b>91</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Volumen der Nebennierenrinde</b>	<b>92</b>
<b>4.5.3</b>	<b>Volumen von Zona fasciculata, Zona glomerulosa und Zone X</b>	<b>93</b>
<b>4.5.4</b>	<b>Mittleres Volumen und Zahl der Zona fasciculata Zellen</b>	<b>95</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>97</b>
<b>5.1</b>	<b>Transkriptomanalyse</b>	<b>97</b>
<b>5.1.1</b>	<b>Hintergrund</b>	<b>97</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse</b>	<b>98</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Validierung mittels quantitativer PCR</b>	<b>98</b>
<b>5.1.4</b>	<b>Identifizierte Gene</b>	<b>99</b>
5.1.4.1	Pre mRNA processing factor (Prp4)	99
5.1.4.2	Peroxisomal Biogenesis Faktor 11c (Pex11c)	99
<b>5.1.5</b>	<b>Interpretation der Ergebnisse</b>	<b>100</b>
<b>5.1.6</b>	<b>Ausblick</b>	<b>101</b>
<b>5.2</b>	<b>Veränderungen in bekannten Signalkaskaden</b>	<b>102</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Hintergrund</b>	<b>102</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Interpretation der Ergebnisse</b>	<b>103</b>
5.2.2.1	Analyse der Signaltransduktion im Alter von 11 Wochen	103
5.2.2.2	Analyse der Signaltransduktion im Alter von 38 Tagen	106
<b>5.2.3</b>	<b>Suche nach weiteren Verbindungsgliedern</b>	<b>106</b>

<b>5.2.4</b>	<b>Ausblick</b>	<b>107</b>
<b>5.3</b>	<b>Morphometrie</b>	<b>108</b>
<b>5.3.1</b>	<b>Hintergrund</b>	<b>108</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Interpretation der Ergebnisse</b>	<b>108</b>
<b>5.3.3</b>	<b>Ausblick</b>	<b>111</b>
<b>5.4</b>	<b>Schlußbetrachtung</b>	<b>112</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>114</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>116</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>118</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>123</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>125</b>
<b>11</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>126</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung</b>	<b>144</b>
<b>13</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>146</b>



## 1 Einleitung

Wachstum und Differenzierung sind zentrale Prozesse bei der Entstehung und Entwicklung des Lebens. Die Größe eines Zellverbandes wird vor allem durch die Balance zwischen Zellwachstum, Proliferation und die Apoptoserate definiert (Lupu et al. 2001). Unterschiedliche Größen von Organen können durch unterschiedliche Zellzahlen und/oder durch unterschiedliche Zellgrößen bedingt sein. So ist der Mensch beispielsweise größer als eine Maus, vor allem weil er mehr Zellen hat (Raff 1996). Im Vergleich dazu wurden bei verschiedenen *Drosophila*-Unterarten unterschiedliche Flügelgrößen aufgrund einer Änderung der Zellgröße entdeckt (Prout & Barker 1989). Allerdings ist bis heute nur unzureichend geklärt, wie das Wachstum durch Zellgröße und -zahl koordiniert ist und wie dadurch Struktur und Funktion von Organen bzw. Organismen entstehen.

Ein zentrales regulatorisches System für die Kontrolle des Wachstums ist das GH/IGF (Wachstumshormon/Insulin-Like Growth Factor)-System. Ohne die endo- und parakrin wirksamen Komponenten GH und IGF-I ist in der Maus postnatal nahezu kein Wachstum möglich. Mäuse, die weder funktionelles GH noch IGF-I besitzen, erreichen nur 17 % der Größe und des Gewichts einer vergleichbaren adulten Maus. Damit stoßen sie an die kleinste gerade noch für ein Säugetier tolerierbare Größe (Lupu et al. 2001). Wichtige Vermittler der gewebespezifischen Wirkungen von IGF-I und -II sind die IGF-Bindungsproteine (IGFBPs). Bislang sind sechs unterschiedliche IGFBPs bekannt, die durch eine hohe Affinität für die IGFs definiert sind und damit deren biologische Wirkungen beeinflussen. Unter den IGFBPs nimmt IGFBP-2 eine besondere Stellung ein, weil es ein *in vivo* relevanter Inhibitor für Wachstum ist. Es konnte gezeigt werden, dass IGFBP-2 die Effekte von GH auf die Zellgröße modulieren kann. Während GH in Zona fasciculata Zellen der Nebenniere 11 Wochen alter Mäuse sowohl Zellzahl als auch Zellgröße stimulierte, wirkte sich die Koexpression von IGFBP-2 in einer Normalisierung der GH-induzierten Zellgröße, nicht jedoch der GH-induzierten Zellzahlerhöhung aus (Hoeftlich et al. 2002). Dieses Modell eignet sich somit ideal, um die Regulation von Zellgröße und Zellzahl getrennt zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen Grundlagen dieser Veränderungen sowohl auf der Ebene des Transkriptoms, als auch der Proteine untersucht. Um Fragen zur Altersabhängigkeit der Wachstumsregulation zu bearbeiten, wurde die Untersuchung an zwei verschiedenen Altersgruppen durchgeführt.

## 2 Literaturteil

### 2.1 Wachstum

Wachstum zählt zu den elementaren Ereignissen im menschlichen Organismus. Nahezu jede Stoffwechseltätigkeit nimmt direkt oder indirekt Einfluss darauf. Man kennt bereits heute eine ganze Reihe wachstumsrelevanter Gene, die in bestimmten Zellsystemen die Größe oder Zahl von Zellen regulieren (Potter & Xu 2001). Die Größe eines Zellverbundes ist nicht durch eine vorbestimmte Anzahl an Zellteilungen festgelegt, sondern einer ständigen Regulation unterworfen (Potter & Xu 2001). Diese Regulationsmechanismen beinhalten eine Kombination aus Größenzunahme der Zelle und von Zellzahlveränderungen, durch Teilung der Zellen oder durch die Apoptoserate (Butler & Le Roith 2001).

Verschiedene Untersuchungen weisen darauf hin, dass Wachstum und Proliferation keine von vornherein festgelegten Parameter sind, sondern dass die Größe eines Organes oder Organismus die Wachstumsaktivität regulieren kann. So kann man von der Leber eines erwachsenen Tieres bis zu zwei Drittel entfernen und sie erreicht doch wieder die volle Größe (Michalopoulos & DeFrances 1997). Auch Embryonen können eine Fusion im 8-Zell Stadium Auswirkungen auf die endgültige Zellzahl und Zellgröße ausgleichen ohne (Lewis & Rossant 1982; Potter & Xu 2001). Versuche in *Drosophila* zeigen, dass der Organismus bei Veränderungen von Zellzahl oder Zellgröße durch ausgleichende Mechanismen entgegenzuwirken versucht, um eine Veränderung der endgültigen Organgröße zu verhindern (Neufeld et al. 1998). Deutlich wird das auch beim Salamander. Bei dieser Spezies gibt es bedingt durch verschiedene Entwicklungsprozesse haploide bis hin zu tetraploiden Nachkommen. Und obwohl die Zellen der tetraploiden Nachkommen viermal so groß sind, wie bei den haploiden Tieren, erreichen alle Salamander die gleiche Größe (FRANKHAUSER 1952). Demnach wird die Größe eines Organs oder Organismus nicht durch seine festgelegte Zellzahl oder Zellgröße bestimmt, sondern durch seine Masse (Su & O'Farrell 1998).

An Hefen wurde gezeigt, dass eine Zelle zunächst eine bestimmte Größe erreichen muss, bevor sie wieder in den Zellzyklus eintreten kann (Johnston et al. 1977). Das weist auf eine enge Verknüpfung zwischen Wachstum und Proliferation hin. Dieser Mechanismus gilt für Eukaryonten aber nur bedingt, denn in eukaryontischen Organismen kann auch Zellteilung

stattfinden, wenn die Größenzunahme unterdrückt wurde und umgekehrt (Grewal & Edgar 2003). Der Mausembryo ist ein prominentes Beispiel. Er entwickelt sich bis zum 128-Zellstadium und trotzdem entspricht seine gesamte Masse immer noch dem einer Zygote (Hensleigh & Weitlauf 1974).

Bei der Kontrolle des Wachstums spielt das IGF-System eine wichtige Rolle (Daughaday et al. 1972; Le Roith et al. 2001). Es ist aber immer noch unzureichend aufgeklärt, wie das Wachstum auf zellulärer Ebene differentiell und spezifisch kontrolliert wird, zumal in verschiedenen Zelltypen charakteristische Mechanismen der Regulation des Wachstums vermutet werden (Fingar et al. 2002; Goberdhan & Wilson 2003b; Kozma & Thomas 2002; Lawlor et al. 2002; Toker & Newton 2000; Volarevic & Thomas 2001).

## **2.2 Die Somatomedin Hypothese**

### **2.2.1 Die ursprüngliche Somatomedin Hypothese**

Bereits vor 50 Jahren war bekannt, dass GH (Growth Hormone, Wachstumshormon, Somatotropin) eine Rolle beim Wachstum spielt. Versuche mit Ratten, denen die GH produzierende Hypophyse entfernt wurde, zeigten als Indiz für Wachstum nach Applikation von Hypophysenextrakt oder bovinem GH eine Einlagerung von  $^{35}\text{SO}_4$  in Rippenknorpel (DENKO & BERGENSTAL 1955; Salmon, Jr. & Daughaday 1990). *In vitro* war dieser Effekt nur minimal (Daughaday & Reeder 1966). Daraus wurde geschlossen, dass es noch einen weiteren Mediator zwischen der Hypophyse und den Organen geben muss. Diese postulierte Substanz wurde Somatomedin genannt (Daughaday et al. 1972).

Zwei Jahrzehnte nachdem Somatomedin postuliert wurde, wurden IGF-I und IGF-II identifiziert. Bei IGF-I handelt es sich um das postulierte Somatomedin, das in Ratten durch zirkulierendes GH reguliert wird (Daughaday & Reeder 1966; Klapper et al. 1983). Auf dieser Basis wurde die erste Somatomedin Hypothese begründet. Diese Hypothese besagt, dass nach der Ausschüttung von GH die Synthese und Ausschüttung von IGF-I in der Leber induziert wird, welches dann erst an verschiedenen Zielorganen das Wachstum stimuliert. IGF-I wird durch das Blut zu den verschiedenen Zielorganen gebracht und wirkt somit auf einem endokrinen Weg. Zirkulierendes IGF-I hat einen negativen Effekt auf die Ausschüttung von GH aus der Hypophyse und reguliert auf diese Weise durch eine negative Rückkopplung das GH-induzierte Wachstum (Berelowitz et al. 1981).

### **2.2.2 Erweiterungen der Somatomedin Hypothese**

Die erste Somatomedin Hypothese musste jedoch modifiziert werden, als festgestellt wurde, dass IGF-I nicht nur in der Leber, sondern auch in anderen Organen produziert wird (D'Ercole et al. 1980). Auch bei Versuchen mit hypophysektomierten Ratten, denen GH injiziert wurde (DENKO & BERGENSTAL 1955), wurde festgestellt, dass GH nicht nur einen Anstieg der IGF-I mRNA in der Leber verursachte, sondern auch in weiteren Organen (Lowe, Jr. et al. 1987). Um diese neuen Befunde mit den Erkenntnissen, die zur alten Somatomedin Hypothese geführt hatten, zu vereinen, wurde IGF-I sowohl eine endokrine Funktion durch hepatisches IGF-I, als auch eine parakrine und autokrine Funktion zugesprochen. Überraschenderweise waren Mäuse mit einem leberspezifischen IGF-I Knockout, trotz deutlich verminderter Serum IGF-I Spiegel nicht kleiner als ihre Geschwister. Diese Befunde stellten die endokrine Bedeutung von IGF-I grundsätzlich in Frage. Allerdings hatten diese Mäuse erhöhte Serum GH Konzentrationen und in einigen Geweben auch erhöhte IGF-I Konzentrationen, die das verminderte Wachstum kompensieren könnten (Yakar et al. 1999). Zusätzlich wiesen diese Mäuse vierfach erhöhte Serum Insulin Konzentrationen auf und entwickelten eine Insulinresistenz im Muskelgewebe. Daher wurde vermutet, dass die IGF-I Bildung von der Leber in die Regulation des Stoffwechsels, nicht aber in die des Wachstums eingreift (Haluzik et al. 2003).

### **2.2.3 Wachstumsregulation durch GH**

Das Peptidhormon GH wird in der Adenohypophyse synthetisiert und gespeichert. Allerdings kann GH auch von anderen Organen gebildet werden, was außer der endokrinen Funktion auch auf einen para- und autokrinen Effekt hinweist (Waters et al. 1999). Die Freisetzung von GH erfolgt pulsatil (Clark et al. 1987; Eden 1979) unter der Steuerung von GH releasing Hormon (GHRH) und Somatostatin (SST). GHRH und SST werden im Hypothalamus produziert (Brazeau et al. 1973; Spiess et al. 1983). Aber auch andere Faktoren sind an der Freisetzung von GH beteiligt. Freie Fettsäuren verhindern die Ausschüttung von GH aus der Adenohypophyse. Dieser Effekt wird auf einen negativen Feedbackmechanismus zurückgeführt, denn eine der Funktionen von GH ist die Mobilisation von Lipiden aus der Zelle (Imaki et al. 1985; Muggeo et al. 1975). Leptin wird von Adipozyten gebildet und kann in den GH Metabolismus eingreifen, in dem es die Ausschüttung von GHRH und SST aus dem Hypothalamus steuert. In diesem Zusammenhang wird auch von einem Rückkopplungsmechanismus durch das Neuropeptid Y gesprochen, dass über eine Regulation der Leptinausschüttung indirekt auf GH wirken kann (Carro et al. 1997; Carro et al. 1998).

Ghrelin mRNA wird vor allem im Magen exprimiert (Kojima et al. 1999). Kleine Mengen der mRNA konnten auch in weiteren Organen nachgewiesen werden (Gnanapavan et al. 2002). Ghrelin induziert die Freisetzung von GH aus der Adenohypophyse in einer dosisabhängigen Menge (Date et al. 2000; Takaya et al. 2000). GHRH und Ghrelin üben synergistische Effekte auf die GH Ausschüttung aus der Adenohypophyse aus (Hataya et al. 2001).

In Überexpressionsmodellen konnte gezeigt werden, dass GH einen positiven Effekt auf das postnatale Wachstum ausübt (Brem et al. 1989; Wanke et al. 1991), dabei spielt es keine Rolle, aus welcher Spezies das GH-Transgen stammt (Posner et al. 1974). Das pränatale Wachstum wird nicht durch GH beeinflusst, denn Mäuse mit einem GH-Rezeptor (GHR) Knockout werden mit demselben Gewicht geboren wie ihre Geschwister. Allerdings erreichen sie postnatal nur 50 % des Gewichts von nichttransgenen Mäusen (Zhou et al. 1997).

Es gibt Hinweise darauf, dass GH auch einen IGF-I unabhängigen Effekt entwickeln kann. Bei Mäusen mit einem leberspezifischen IGF-I Knockout findet man erhöhte GH Serumspiegel. Gleichzeitig zeigen die Mäuse vergrößerte Lebern. Dieser Effekt muss auf den erhöhten GH-Serumspiegel zurückzuführen sein, da Hepatozyten keine IGF-I Rezeptoren besitzen (Wallenius et al. 2001). Auch die Kreuzung zwischen IGF-I und GHR Knockout Mäusen wirkt sich in einer deutlich stärkeren Wachstumsverminderung aus, als bei lediglich der Ausschaltung von nur einer der beiden Komponenten. Mäuse, die weder über funktionales IGF-I noch einen GHR verfügen, erreichen lediglich 13 % des Körpergewichts ihrer Kontrollgeschwister. Einen solchen verstärkenden Effekt würde man nicht erwarten, wenn GH alleine über IGF-I wirken würde (Lupu et al. 2001).

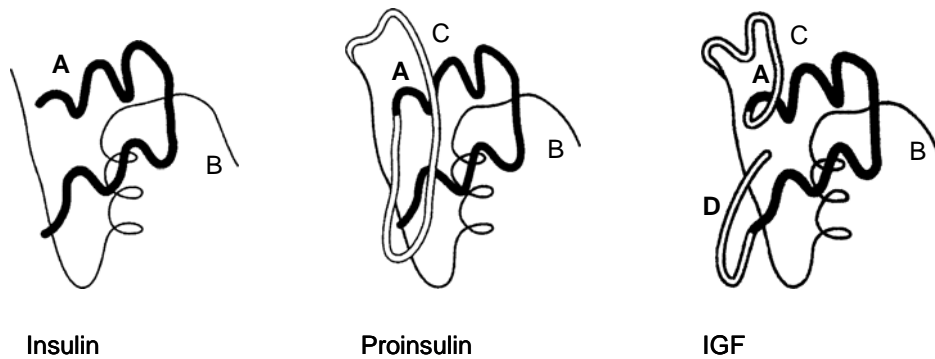
## **2.3 Das IGF System**

Das IGF-System besteht aus den Peptidhormonen IGF-I und IGF-II, zwei Rezeptoren und sechs Bindungsproteinen (IGFBP-1 bis -6). Bei den Rezeptoren wird zwischen dem IGF-I Rezeptor und dem Mannose-6-Phosphatrezeptor (M-6-P), den man auch IGF-II Rezeptor nennt, unterschieden. Es gibt Hinweise, dass auch der Insulinrezeptor vor allem für IGF-II als Rezeptor dienen kann. Allerdings handelt es sich dabei um eine bestimmte Spleißvariante, die eher mitogene Effekte auf die Zelle hat im Gegensatz zu den metabolischen Effekten bei einer Bindung von Insulin (Frasca et al. 1999).

### **2.3.1 IGF-I und IGF-II**

Die Peptidhormone IGF-I (70 Aminosäuren) und IGF-II (67 Aminosäuren) haben eine dem Insulin ähnliche Proteinstruktur (Abbildung 1). Diese strukturelle Ähnlichkeit spiegelt sich

auch in funktionellen Gemeinsamkeiten wider. IGF-I und IGF-II stimulieren ähnlich wie Insulin die Glukoseaufnahme in Fett- oder Muskelzellen (Rinderknecht & Humbel 1978). Neugeborene, deren Mütter Diabetes und damit einen erhöhten Insulinspiegel haben, zeigen eine deutliche Organvergrößerung.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der dreidimensionalen Strukturen von Insulin, Proinsulin und IGF (Blundell & Humbel 1980).**

#### 2.3.1.1 IGF-I

IGF-I ist nicht nur am Wachstum beteiligt, sondern auch am Glukosemetabolismus (Clemmons 2004), sowie an der Steuerung der Ausbildung des Immun- (Heemskerk et al. 1999) und des Nervensystems (Anderson et al. 2002; Trejo et al. 2004). Die IGF-I Spiegel steigen nach der Geburt deutlich an. Das führte fälschlicherweise zu der Annahme, dass es in der Embryonalentwicklung keine Rolle spielt, doch heterozygote *igf1* Knockout Mäuse haben ein deutlich niedrigeres Geburtsgewicht als ihre Kontrollgeschwister. Homozygote Mäuse erreichen nur 60 % des normalen Geburtsgewichts und über 95 % von ihnen sterben während der Geburt (Powell-Braxton et al. 1993). IGF-I transgene Mäuse weisen ab dem Alter von etwa drei Wochen höhere Gewichtszunahmen auf als ihre nicht transgenen Geschwister (Behringer et al. 1990). Muskeln, Gehirn, Niere und Pankreas sind von den Zunahmen am deutlichsten betroffen. Exogenes IGF-I führte zu einer deutlichen Vergrößerung von Herzmuskelzellen der Ratte in der Zellkultur (Huang et al. 2002).

#### 2.3.1.2 IGF-II

IGF-II ist vor allem wichtig für eine normale embryonale Entwicklung (De Chiara, 1990). Bei Nagetieren sinkt der IGF-II Spiegel nach der Geburt deutlich ab. Tiere mit einem IGF-II Knockout werden mit einem etwa 50 % verminderten Gewicht geboren. Allerdings wachsen sie nach der Geburt im selben Maße wie ihre Wildtyp Geschwister. In der Maus unterliegen

*igf2* bzw. das *igf2r* Gen dem Imprinting, das heißt, dass nur eines der beiden Allele exprimiert wird. Beim *igf2* Gen wird das paternale Allel exprimiert, wohingegen beim *igf2r* Gen nur das maternale Allel exprimiert wird (Birger et al. 1999; Polychronakos 1993; Stoger et al. 1993; Wang et al. 1994a; Wylie et al. 2003). Man vermutet, dass durch das Wechselspiel der jeweiligen Wachstumssignale das fötale Wachstum sehr genau reguliert werden kann.

### **2.3.2 IGF-I und IGF-II Rezeptor**

#### **2.3.2.1 IGF-I Rezeptor**

Der IGF-I Rezeptor (IGFIR) gehört, wie auch der Insulinrezeptor zur Proteinfamilie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Beide bestehen aus zwei extrazellulären  $\alpha$ -Untereinheiten und zwei intrazellulären  $\beta$ -Untereinheiten (Steele-Perkins et al. 1988), die durch Disulfidbrücken zu einem tetrameren Molekül verbunden sind. Die Homologie der Aminosäuresequenz der beiden Rezeptoren beträgt 53 %. Der IGFIR bindet auch Insulin, allerdings mit einer etwa 500-fach geringeren Affinität als die beiden IGFs (Jones & Clemmons 1995). Mit Ausnahme der Hepatozyten und B-Zellen wird der IGFIR ubiquitär exprimiert (Valentinis & Baserga 2001). IGF-I und IGF-II vermitteln ihre Hauptwirkung auf die Zelle durch den IGFIR (Lopaczynski *et al.* 1993). Die Liganden binden an die extrazellulären  $\alpha$ -Untereinheiten und initiieren über eine Konformationsänderung die Autophosphorylierung verschiedener Tyrosinreste in der  $\beta$ -Untereinheit. Dadurch wird die Bindung verschiedener endogener Substrate an so genannte „docking sites“ ermöglicht (Butler et al. 1998). Ohne den funktionellen IGFIR ist kein Überleben möglich. Homozygote *igf1r*  $-/-$  Mäuse sterben perinatal, haben bis zu diesem Zeitpunkt nur 45 % des Gewichts ihrer Kontrollgeschwister erreicht und zeigen zusätzlich generalisierte Entwicklungsanomalien (Baker et al. 1993).

#### **2.3.2.2 Mannose 6-Phosphat Rezeptor (IGF-II Rezeptor)**

Der IGFIR wurde ursprünglich als monomeres Protein beschrieben, mittlerweile ist aber bekannt, dass er unter bestimmten Umständen auch dimerisieren kann (Byrd *et al.* 2000). Er ist ein multifunktionales Protein, der seinen Namen erhielt, weil er zwei Bindungsstellen für Mannose 6-Phosphat (M6P) besitzt. Außer M6P tragenden lysosomalen Enzymen (Marzella & Glaumann 1983) kann er auch noch den Urokinase-Rezeptor (uPAR), Proliferin, Transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), Retinsäure und vermutlich auch Thyreoglobulin binden. Die Funktionen des IGFIR liegen einerseits im Transport der lysosomalen Enzyme

vom Golgi Apparat zu den Lysosomen (Chen *et al.* 1997) oder aus dem extrazellulären Raum in das Zellinnere durch Endozytose (Kornfeld 1992; Puertollano *et al.* 2001; Zhu *et al.* 2001b). Andererseits kontrolliert er, ebenfalls durch Endozytose und Proteolyse in den Lysosomen, die extrazellulären IGF-II Spiegel (Kiess *et al.* 1987; Oka *et al.* 1985). *Igf2r* Knockout Mäuse sind aufgrund erhöhter IGF-II Serumspiegel etwa 30 % schwerer als ihre Geschwister (Ludwig *et al.* 1996; Wang *et al.* 1994b).

### **2.3.3 IGF-Bindungsproteine (IGFBPs)**

#### **2.3.3.1 Allgemeine Struktur und Funktionsmechanismen**

Die IGFBPs spielen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung gewebespezifischer Wirkungen der IGFs. Mittlerweile wurden sechs verschiedene IGFBPs identifiziert, die aus 216 (IGFBP-6) bis 289 (IGFBP-2) Aminosäuren bestehen (Rosenzweig 2004). Anhand der Aminosäuresequenz lassen sich zwei globuläre terminale Domänen postulieren, die durch eine Linkerregion getrennt sind (Spencer & Chan 1995). Diese Bereiche sind hoch konserviert zwischen den Spezies, wohingegen die zentrale Domäne keine hohe Ähnlichkeit zeigt. Bei Strukturuntersuchungen fanden sich sowohl in der N-terminalen als auch in der C-terminalen Region Bereiche, die an der Bindung von IGF-I beteiligt sind. Daraus wurde geschlossen, dass es bei der Bindung von IGF-I zu einer Taschenbildung kommt (Rosenzweig 2004). Die Affinität der IGFBPs zu IGF-I ist höher als zwischen IGF-I und dem IGFIR. Eine Bindung an die Zellmembran oder eine Phosphorylierung der IGFBPs kann die Affinität der IGFBPs zu IGF-I reduzieren und dadurch IGF-I an den Rezeptor vermittelt werden (Blakesley *et al.* 1996). Durch die Bindung der IGFs an die IGFBPs können die Halbwertszeiten der IGFs deutlich erhöht werden. Freies IGF-I besitzt im Serum eine Halbwertszeit von nur etwa 10 Minuten, während diese im Komplex mit den IGFBPs 20 bis 30 Minuten betragen kann (Guler *et al.* 1989). IGFBP-3 und -5 können zusätzlich noch eine Bindung mit einer säurelabilen Untereinheit (ALS) zu 150 bzw. 130 kDa trimeren Komplexen eingehen (Martin & Baxter 1986; Twigg *et al.* 1998). In diesem Komplex kann IGF eine Halbwertszeit von 12-15 Stunden besitzen.

#### **2.3.3.2 Spezielle Eigenschaften *in vitro* und *in vivo***

Über verschiedene *in vitro* und *in vivo* Modelle, wurde in den letzten Jahren versucht, den einzelnen IGFBPs Funktionen zuzuordnen. Hierzu wurden aus verschiedenen Zellkulturen Knockout- und Überexpressionsmodelle entwickelt sowie transgene Tiermodelle etabliert.



Interessanterweise konnten die Funktionen der IGFBPs durch den Knockout Ansatz nicht aufgeklärt werden. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, dass in Einzel- oder Mehrfach-IGFBP-Knockout Experimenten die noch vorhandenen IGFBPs deutlich hochreguliert wurden und aufgrund der funktionellen Redundanz der IGFBPs nur sehr wenige phänotypische Auswirkungen beobachtet werden konnten (Pintar et al. 1995).

#### 2.3.3.2.1 IGF-abhängige Effekte der IGFBPs

IGFBP-1 war das erste Mitglied aus der IGFBP Familie, das entdeckt wurde. *In vitro* Studien lassen vermuten, dass seine Hauptfunktion eine negative Regulation des Zellwachstums und der Differenzierung ist (Lee et al. 1988). In IGFBP-1 transgenen Tiermodellen konnten unabhängig von der Linie verschiedene morphologische Veränderungen einschließlich einer deutlichen Gewichtsreduktion im Gehirn beobachtet werden (D'Ercole et al. 1994; Dai et al. 1994; Rajkumar et al. 1995). Zusätzlich wurden eine Verminderung des Körpergewichts festgestellt sowie verschiedene Auswirkungen auf physiologische Funktionen. Unter anderem limitiert IGFBP-1 in Kombination mit IGF-I den hypoglykämischen Effekt von IGF-I und bei alleiniger Verabreichung steigen die Glukosespiegel an (Lewitt et al. 1991). Aus den Uterushörnern von IGFBP-1 transgenen weiblichen Tieren konnten weniger Eizellen als bei nicht transgenen Tieren, gewonnen werden (Huang et al. 1997). IGFBP-3 stellt im Serum den höchsten Teil der Bindungsproteine dar, und außerdem ist ein großer Teil des zirkulierenden IGF-I daran gebunden. Im IGFBP-3 transgenen Tiermodell wurden erhöhte Gewichte von Herz, Leber und Milz, verminderte Wurfgröße und gestörte Glukosetoleranz beobachtet (Silha & Murphy 2002). Für IGFBP-4 wurden transgene Mäuse erstellt, die eine spezifische Expression des Transgens in der glatten Muskulatur aufweisen. Sie zeigen verminderte Gewichte von Aorta, Magen und Harnblase bei gleichzeitiger Muskelhypoplasie (Wang et al. 1998). In glatten Muskelzellen werden IGFBP-4 und IGFBP-5 durch IGF-I gegenläufig reguliert. Während der IGFBP-4 Spiegel durch die Freisetzung von spezifischen Proteasen gesenkt wird, erfährt IGFBP-5 eine Steigerung aufgrund einer vermehrten Transkription (Duan & Clemmons 1998). Aber auch in anderen Zellen wurde eine ähnliche Regulation von IGFBP-4 durch Proteasen beobachtet (Conover et al. 1993; Durham et al. 1995; Kanzaki et al. 1994). IGFBP-4 und IGFBP-5 stellen die wichtigsten IGFBPs im Knochenmetabolismus dar. Nach Studien in Zellkultursystemen wurden antagonistische Funktionen vermutet, wobei IGFBP-4 einen negativen Einfluss ausübt und IGFBP-5 Knochenwachstum stimuliert. Im transgenen Tiermodell konnte diese Funktion von IGFBP-4 (Zhang et al. 2003), nicht aber die von IGFBP-5 bestätigt werden (Devlin et al. 2002). IGFBP-5 transgene Mäuse zeigen vermindertes trabekuläres Knochenvolumen und eine gehemmte Aktivität und Funktion der

Osteoblasten sowie Osteopenie. Ein anderes IGFBP-5 transgenes Tiermodell zeigte ein vermindertes Körpergewicht, kleine Würfe und eine reduzierte Muskelentwicklung (Salih *et al.* 2004). Für IGFBP-5 ist IGF-I ein wichtiger Regulator. In gesunden adulten Individuen sind die Serum IGF-I Spiegel mit den Serum IGFBP-5 Spiegeln eng korreliert (Mohan *et al.* 1996). IGF-I führt einerseits zu einer Steigerung der IGFBP-5 Konzentration, in dem es positiv auf die Transkription wirkt, andererseits verhindert eine Bindung von IGFBP-5 an IGF-I die Proteolyse des Bindungsproteins (Matsumoto *et al.* 1996). Für IGFBP-6 vermutet man einen hemmenden Effekt auf die Wirkung von IGF-II (Bach 1999), da IGFBP-6 die höchste Affinität für IGF-II besitzt. IGFBP-6 transgene Mäuse mit spezifischer Transgenexpression im ZNS zeigten auch im Serum erhöhte IGFBP-6 Konzentrationen (Bienvenu *et al.* 2004). Diese Tiere zeigen ein vermindertes Körpergewicht, eine gestörte Hirnentwicklung sowie eine massiv reduzierte Wurfgröße (bis 66 %).

#### 2.3.3.2.2 IGF-unabhängige Effekte der IGFBPs

IGFBPs können durch verschiedene Mechanismen IGF-unabhängige Effekte verursachen. Sie können durch verschiedene Strukturmodule an Zelloberflächen binden. An dieser Bindung sind vermutlich bestimmte Heparin-Bindungs-Domänen von IGFBP-2, -3, -5 und -6 oder die RGD-Domänen von IGFBP-1 und -2 beteiligt (Fowlkes *et al.* 1997; Parker *et al.* 1998). IGFBP-1 interagiert über seine RGD-Domäne mit  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrinen und kann so die Zellproliferation und Zelladhäsion beeinflussen (Irving & Lala 1995) beeinflussen. IGFBP-2 kann an Proteoglykane (Russo *et al.* 1997) und  $\alpha \nu \beta 3$  Integrine (Pereira *et al.* 2004) binden. Die IGF-unabhängigen Effekte von IGFBP-3 sind am besten untersucht und am häufigsten beschrieben worden. IGFBP-3 kann, wie auch IGFBP-5, in den Zellkern translozieren, und dort eigene Effekte entfalten (Jaques *et al.* 1997). Auch in IGFIR defizienten Zellen wurden verschiedene IGF-unabhängige Effekte von IGFBP-3 bzw. IGFBP-3 Fragmenten beschrieben (Lalou *et al.* 1996; Zadeh & Binoux 1997). Exogenes IGFBP-3 induziert Apoptose durch einen IGF-unabhängigen Mechanismus (Williams *et al.* 2000). In Brustkrebszellen wurde vermutet, dass IGFBP-3 die wachstumshemmenden Effekte von TGF $\beta$ 1 oder Retinsäure vermittelt (Lippman *et al.* 1987; Martin *et al.* 1992). IGFBP-4 übt IGF-unabhängig einen hemmenden Effekt auf die Koloniebildung von Kolonkrebszellen in Methylcellulose aus (Diehl *et al.* 2004). Für IGFBP-5 wurde eine IGF-unabhängige Stimulation der Proliferation von Knochenzellen beschrieben (Andress 2001).

### 2.3.3.3 IGFBP-2

#### 2.3.3.3.1 Struktur von IGFBP-2

Das *igfbp2* Gen enthält 4 Exons und ist je nach Tierart unterschiedlich lang (8 - 38 kb). Bei der Maus liegt es auf Chromosom 1 und hat ein Molekulargewicht von 32,8 kD. Die mRNA für IGFBP-2 wird bereits in der Präimplantationsphase und während der gesamten Embryonalentwicklung hindurch exprimiert (Schuller et al. 1993). Postnatal ist es das zweithäufigste Bindungsprotein im Blut und kann auch in anderen Kompartimenten nachgewiesen werden.

#### 2.3.3.3.2 IGFBP-2 *in vitro* und *in vivo*

Die Serumspiegel von IGFBP-2 sind häufig unter unphysiologischen Bedingungen, wie z.B. während des Fastens, im Schock oder nach einem Trauma, erhöht (Wolf et al. 2000). Veränderungen in IGFBP-2 Knockout Mäusen konnten nur in männlichen Tieren nachgewiesen werden. Es wurden erhöhte Leber- und Milzgewichte festgestellt (Wood et al. 1993).

Der Nachweis von IGFBP-2 als *in vivo* relevanter negativer Wachstumsfaktor wurde durch eine kombinierte Interpretation von Ergebnissen aus Selektionslinien und einem transgenen Tiermodell erbracht: In Mäuselinien, die auf ein niedriges Körpergewicht gezüchtet worden waren, konnten erhöhte IGFBP-2 Spiegel im Serum und erhöhte mRNA Konzentrationen in der Leber nachgewiesen werden (Hoeftlich et al. 1998). Auf der anderen Seite wiesen IGFBP-2 transgene Mäuse ein deutlich vermindertes Körperwachstum auf. Darauf aufbauend wurden verschiedene *in vivo* und *in vitro* IGFBP-2 Überexpressionsstudien durchgeführt, um den Effekt von IGFBP-2 auf das Körper- und Organwachstum genauer zu charakterisieren.

#### *Funktionale Analyse in vitro*

Die *in vitro* Studien ergaben kontroverse Ergebnisse. In humanen Nierenfibroblasten wurde eine Wachstumshemmung durch eine Überexpression von IGFBP-2 festgestellt, die durch exogenes IGF-I vollständig aufgehoben werden konnte (Hoeftlich et al. 1998). Damit war in nicht-malignen Zellen ein IGF-abhängiger negativer Mechanismus aufgezeigt worden. Unter malignem Wachstum wird aber oft erhöhte Expression von IGFBP-2 nachgewiesen (Hoeftlich et al. 2001b). Dabei ist nicht klar, ob IGFBP-2 in die Tumorentstehung und -progression involviert ist. Um einen Zusammenhang zwischen IGFBP-2 und malignem Wachstum zu untersuchen, wurden Nebennierenrindentumorzellen stabil mit IGFBP-2 transfiziert. Diese Zellen zeigten eine veränderte Morphologie, erhöhte Proliferationsraten und eine erhöhte

Transformationsrate. In der Kontrollgruppe konnte durch exogenes IGF-I die Proliferationsrate nicht annähernd auf dasselbe Niveau gebracht werden, was als Hinweis für einen IGF-unabhängigen Mechanismus des malignen Potentials von IGFBP-2 gewertet wurde (Hoeftlich et al. 2000). In der Zwischenzeit wurden differentielle Effekte von IGFBP-2 unter malignen und nicht-malignen Bedingungen auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Moore et al. 2003).

#### *Funktionale Analyse in vivo*

Für die funktionale Analyse *in vivo* wurde eine IGFBP-2-transgene Mäuselinie etabliert. Als Promoter wurde der CMV-Promoter verwendet, da dieser ubiquitär exprimiert wird. In allen Organen dieser Linie, außer der Leber, konnten erhöhte IGFBP-2 Proteinnengen nachgewiesen werden. Die Serum IGFBP-2 Werte waren etwa dreifach erhöht im Vergleich zu nicht transgenen Mäusen. Eine Reduktion des postnatalen Wachstums wurde ab der dritten Lebenswoche deutlich. Die Gewichtsreduktionen waren in Karkasse, Pankreas, Milz und Niere am deutlichsten ausgeprägt. IGF-I transgene Mäuse zeigen die deutlichsten Gewichtssteigerungen in genau denselben Organen, was zu der Folgerung führte, dass es sich bei der Gewichtsreduktion vor allem um einen IGF-I abhängigen Effekt handelt (Hoeftlich et al. 1999).

Um den Effekt von IGFBP-2 unter erhöhten GH/IGF-I Spiegeln spezifisch zu untersuchen, wurden IGFBP-2-transgene Tiere mit GH-transgenen Tieren verpaart. Tatsächlich hatte IGFBP-2 einen stärker hemmenden Effekt auf das Wachstum von GH-transgenen Mäusen. Damit konnte der Mechanismus der IGFBP-2 Wirkung *in vivo* aufgezeigt werden (Hoeftlich et al. 2001a). Da auch die Leber von der Reduktion betroffen ist, obwohl Hepatozyten keine IGF-I Rezeptoren besitzen, wurde vermutet, dass IGFBP-2 einen IGF-unabhängigen Effekt auf GH vermitteltes Wachstum in der Leber ausübt. Auch die Lebervergrößerung in IGFBP-2 Knockout Mäusen weist auf einen Effekt von IGFBP-2 auf die Regulation des Leberwachstums hin (Wood et al. 1993).

#### *IGF-I unabhängige Wirkungen von IGFBP-2*

IGFBP-2 besitzt eine RGD-Sequenz und eine Heparinbindungsdomäne. Um die funktionelle Relevanz der RGD-Domäne *in vivo* zu untersuchen, wurde sie in eine RGE-Domäne umgewandelt. Trotz der Mutation konnte IGFBP-2 an Zellmembranen binden (Hoeftlich, 2002). Von einer anderen Arbeitsgruppe konnte *in vitro* gezeigt werden, dass das RGD-Motiv spezifisch an Integrine von Tumorzellen bindet. Auch die Beeinflussung intrazellulärer

Signalkaskaden durch Dephosphorylierung von fokaler Adhäsionskinase und MAPK konnte gezeigt werden (Schutt et al. 2004).

IGFBP-2 induziert die Expression von Genen, deren Produkte die Invasion von Tumorzellen fördern (Wang *et al.* 2003). Beispielsweise die Genexpression der Matrix-Metalloprotease (MMP-2) wird angeregt. Die proteolytische Aktivität von MMP-2 ist für das Durchbrechen der Basalmembran notwendig. Mittlerweile ist sogar ein IGFBP-2-Bindungsprotein identifiziert worden. Entsprechend seiner Funktion wurde es Invasions-inhibitorisches Protein Iip45 genannt. Iip45 vermindert die durch IGFBP-2 induzierte Invasionsfähigkeit von multiformen Glioblastomzellen (Song et al. 2003).

## **2.4 Signaltransduktion**

Unter Signaltransduktion versteht man die Weiterleitung von Informationen. Die Fähigkeit, intrazelluläre Informationen zu verarbeiten, ist essentiell für das Überleben und die Entwicklung aller Lebewesen. Signale können endokrin, durch Verteilung über Körperflüssigkeiten (z.B. Blut), parakrin zwischen benachbarten Zellen oder auch autokrin, von der Zelle auf sich selbst, weitergeleitet werden. Bei den Botenstoffen kann es sich um ganz unterschiedliche Substanzen handeln, oft sind es Peptide oder Proteine. In andere Stoffklassen fallen z.B. Aminosäurederivate, wie Tyroxin, Histamin oder Adrenalin, Fettsäurederivate wie Prostaglandine und Abkömmlinge des Cholesterols wie die Steroidhormone (Koolman & Röhm 1998). Einige dieser Stoffe sind fettlöslich und können direkt in die Zelle eindringen, doch die meisten wirken über membranständige Rezeptoren. Es gibt verschiedene Formen von Zelloberflächenrezeptoren, bei allen bewirkt die Bindung des Liganden eine Konformationsänderung des Rezeptors, über die das Signal an intrazelluläre Signaltransduktionskomponenten weitergeleitet wird (Koolman & Röhm 1998).

Man unterscheidet drei Klassen von Oberflächenrezeptoren:

1. Ionenkanal-gekoppelte Rezeptoren führen nach Ligandenbindung zur Öffnung eines Ionenkanals für Natrium-, Kalium- und Chloridionen. Diesen Mechanismus nutzen Neurotransmitter, wie z.B. Acetylcholin (Koolman & Röhm 1998).
2. G-Protein gekoppelte Rezeptoren übertragen Signale mit Hilfe von G-Proteinen. G-Proteine tragen im inaktiven Zustand ein GDP. Eine Konformationsänderung des Rezeptors ermöglicht die Bindung des G-Proteins und den Austausch von GDP zu GTP. Das führt zu einer Aktivierung des G-Proteins und ermöglicht die Signalübertragung auf weitere Effektorproteine. Durch langsame enzymatische Hydrolyse wird GTP wieder zu GDP und das Protein inaktiv (Koolman & Röhm 1998).

3. Rezeptoren mit einer eigenen enzymatischen Aktivität. Die Hauptgruppe davon stellen die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK). Die Bindung des Signalstoffes führt zu einer Konformationsänderung, die eine Autophosphorylierung, aber auch die Phosphorylierung der Tyrosinreste in anderen Proteinen ermöglicht. Die phosphorylierten Tyrosinreste initiieren nach Bindung und Aktivierung von Proteinen, die eine SH Domäne enthalten, intrazelluläre Signalkaskaden. Zu den RTKs gehören unter anderem der Insulinrezeptor und der IGFIR (Koolman & Röhm 1998).

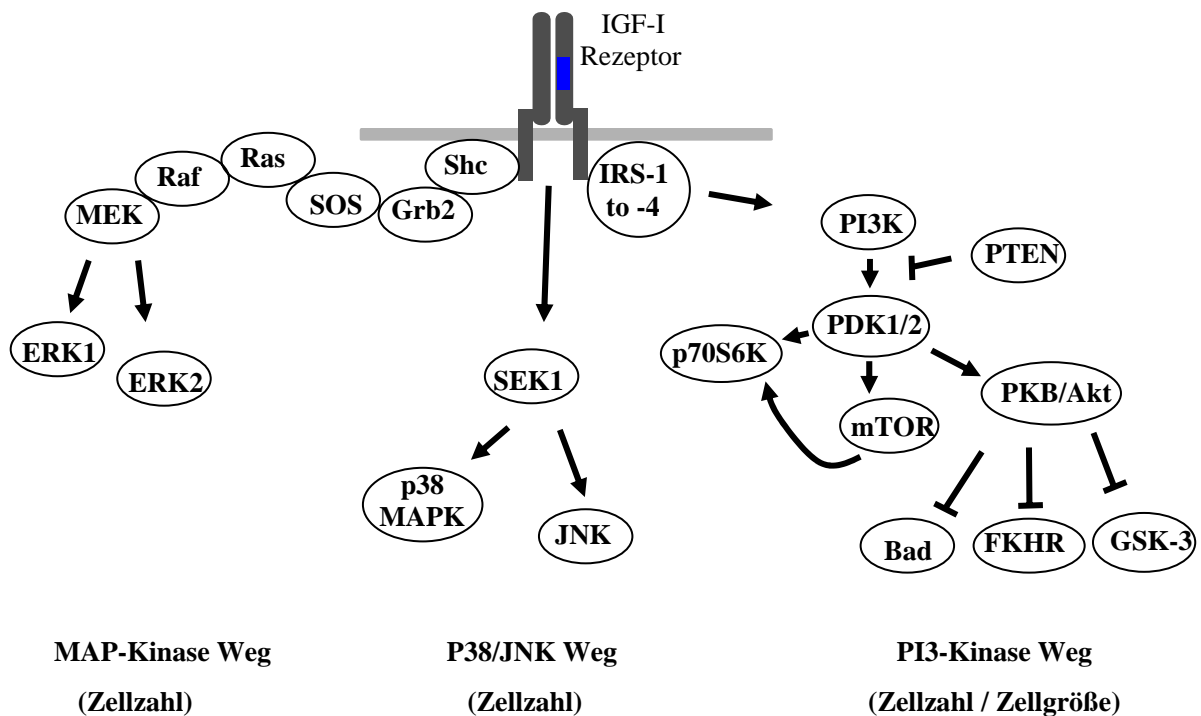
#### **2.4.1 IGF Rezeptor Signaltransduktion**

Der IGFIR aktiviert direkt drei verschiedene Signalkaskaden (Abbildung 2), wobei mindestens fünf unterschiedliche Proteinfamilien beteiligt sind (Frattali & Pessin 1993; Wilden et al. 1989):

1. Growth Factor Receptor Bound Proteine (GRB Proteine) besitzen Src-Homologie Domänen (SH2 und SH3 Domänen) und binden phosphorylierte Tyrosinreste. GRB2 bindet nicht direkt an den IGFIR, sondern vermittelt Signale zwischen SHC (SH containing), SOS (son of sevenless) und Ras (rat sarcoma) und ist damit an der Kontrolle von Zellproliferation und Apoptose beteiligt (Sasaoka et al. 1994).
  2. SHC Proteine enthalten eine SH2 Domäne sowie eine Bindungsstelle für andere SHC Proteine. SHC Proteine werden durch den aktivierten IGFIR phosphoryliert und können erst dann an GRB2 binden (Sasaoka et al. 1994).
  3. Insulin Rezeptor Substrat Proteine (IRS Proteine) besitzen mehrere PTB und PH Pleckstrin-Homologie Domänen (PH Domänen) sowie eine Reihe von Tyrosinresten, die mit den SH Domänen interagieren können. Bislang sind vier verschiedene IRS Varianten bekannt (IRS-1 bis -4) (Sun et al. 1995). IRS-1 und -2 treten mit bestimmten Regionen des IGFIR in Wechselwirkung (He et al. 1996), wohingegen IRS-3 und -4 mit dem Insulinrezeptor interagieren.
  4. CRK (CT10 regulator of kinase) Proteine können über ihre SH2 und SH3 Domänen an SOS oder IRS binden. CRK-II kann auch direkt an den IGF-IR binden. IGF-I stimuliert die Phosphorylierung von CRK-II (Beitner-Johnson et al. 1996), welches dann die mitogene Ras/Raf/mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK) Kaskade aktiviert.
  5. p85 ist die regulatorische Untereinheit der Phosphatidylinositol 3-Kinase und bindet sowohl an den IGFIR als auch an IRS-1 oder -2 (Lamothe et al. 1995).
- (Übersicht entnommen aus (Hoeftlich A. et al. 2005))

Die wichtigsten Signalkaskaden, die in Gang gesetzt werden heißen p44/42 MAPK Weg, p38 MAPK-Weg und PI3K-Weg.

Für den PI3K-Weg wurden positive Effekte sowohl auf Zellzahl als auch Zellgröße beschrieben (Coelho & Leever 2000), was ihm eine wichtige Rolle bei der Untersuchung der Zellgrößenregulation zuweist.



**Abbildung 2: Hauptsignalwege der Regulation von Zellzahl und Zellgröße durch den IGFIR (Hoeflich A. et al. 2005)**

#### 2.4.1.1 Der Phosphatidylinositol 3-Kinase-Signalweg (PI3K-Weg)

Über den PI3K-Weg kann sowohl die Zellzahl, als auch die Zellgröße reguliert werden. In einzelnen konnten den jeweiligen Komponenten des PI3K Weges (IRS-1, PTEN, TSC1/TSC2, PI3K, PDK-1, Akt, mTor, S6-Kinase, 4EBP) in unterschiedlichen Modellen spezifische Effekte auf die Zellgröße zugewiesen werden. Auch in *Drosophila* wurden für einzelne Komponenten orthologe Proteine gefunden, was auf hochkonservierte Funktionen des PI3K-Weges hindeutet. Mutationen in Komponenten des Signalweges (IRS, Akt, PTEN, PDK, S6K) in *Drosophila* führten zu vergleichbaren Veränderungen mit denen von Säugern, was ein weiterer Hinweis für dessen Bedeutung ist (Goberdhan & Wilson 2003b). Der PI3K Signalweg wird unter anderem durch Insulin oder die IGFs an ihre Rezeptoren ausgelöst. Eine Konformationsänderung des Rezeptors führt nach Tyrosinauto-phosphorylierung zur Rekrutierung von Insulin Rezeptor Substrat (IRS) an den Rezeptor. Das Multiadaptorprotein

IRS bildet daraufhin zusammen mit der PI3K einen membrangebundenen Komplex, der durch Phosphorylierung Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) umwandelt. PIP<sub>3</sub> fungiert nun als second messenger und kann Phosphoinositide Dependent Kinase (PDK1) und Protein Kinase B (PKB) aktivieren. Dieser Aktivierungsschritt spielt eine zentrale Rolle und führt zur Aktivierung der S6 Kinase, aber auch zu einer Inaktivierung von Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3) und Forkhead (FKHR), einem Transkriptionsfaktor. Ein bisher unbekannter Mechanismus führt zur Aktivierung von mammalian Target of Rapamycin (mTOR), was dann wiederum zu einer erhöhten Phosphorylierung von Initiations Faktor 4E Bindungsprotein (4E-BP1) und S6 Kinase führt. Der PI3K-Weg ist auch mit verschiedenen regulierenden Faktoren verknüpft, wie Phosphatase and Tensin Homolog deleted on Chromosome 10 (PTEN) und den Tuberous Sclerosis Komplex Proteinen 1 und 2 (TSC 1 und 2) (Übersicht entnommen aus (Kozma & Thomas 2002)).

#### 2.4.1.1.1 Insulin Rezeptor Substrat (IRS)

Bisher sind vier Insulin Rezeptor Substrate (IRS 1-4) bekannt. IRS-1 und -2 treten mit dem IGFIR in Wechselwirkung (He et al. 1996). IRS-3 und -4 interagieren mit dem Insulin Rezeptor. IRS-1 Knockout Mäuse zeigen eine starke Wachstumsverminderung (Tamemoto *et al.* 1994), wohingegen IRS-2 Knockout Mäuse einen Diabetes mellitus Typ II entwickeln (Kubota *et al.* 2000). Von der IRS-1 Konzentration hängt ab, ob IGF-I einen mitogenen Effekt auf die Zelle ausübt, oder Signale zur Differenzierung der Zellen weitergibt. Hohe IRS-1 Spiegel können zur Auslösung von Mitosen führen, wohingegen die Abwesenheit von IRS-1 in hämatopoetischen Zellen zur Differenzierung führt (Valentinis & Baserga 2001).

#### 2.4.1.1.2 Phosphatase and Tensin Homolog deleted on Chromosome 10 (PTEN)

PTEN ist eine Phosphatase, die bei humanen Krebserkrankungen häufig verändert ist (Di Cristofano & Pandolfi 2000). Mutiertes PTEN ist der Auslöser für die Cowdens Krankheit (Li & Sun 1997), ein Syndrom, das zur Entwicklung von gutartigen Wucherungen führt. Daher wird es auch als Tumor Suppressor Gen bezeichnet. PTEN ist nur moderat aktiv bei der Dephosphorylierung von Proteinen im allgemeinen, zeichnet sich aber durch eine hohe Affinität zu Fettsäuren aus. PIP<sub>3</sub> ist das Hauptsubstrat von PTEN (Maehama & Dixon 1998), daher wirkt PTEN hemmend auf den PI3K-Weg. PTEN Überexpression bei *Drosophila* führt zu einer Abnahme der Zellgröße und damit auch zu einer Abnahme der Größe der gesamten Organe (Goberdhan et al. 1999). Da homozygote PTEN <sup>-/-</sup> Mäuse nicht überlebensfähig sind (Di Cristofano & Pandolfi 2000), wurden heterozygote PTEN Knockout Mäuse etabliert.



Diese zeigten multiple Formen von Tumoren und Anzeichen von Autoimmunkrankheiten (Di Cristofano et al. 1998; Di Cristofano et al. 1999). Nicht nur im PI3K-Weg spielt PTEN eine Rolle als negativer Regulator, so kann es z.B. die Phosphorylierung von FAK und Shc beeinflussen und damit auf Zellmigration einwirken (Gu et al. 1998).

#### 2.4.1.1.3 Phosphoinositide Dependent Kinase 1 und 2 (PDK1 und PDK2)

PDK1 steht im Mittelpunkt des PI3K Pathway und stellt damit in der Signalübertragung eine zentrale Rolle dar (Toker & Newton 2000). Ursprünglich wurde PDK1, wegen seiner Fähigkeit im Komplex mit PIP<sub>3</sub> und PI3K, Akt zu phosphorylieren, entdeckt (Alessi et al. 1997). PDK1 ist eine Serin/Threonin Kinase. Eine Pleckstrin-Homologie (PH) Domäne ermöglicht die Signalaufnahme von PIP<sub>3</sub>. Mittlerweile weiß man, dass PDK1 durch seine Kinasefunktion in der Lage ist auch viele weitere Substrate unabhängig von PIP<sub>3</sub> zu aktivieren. PDK1 phosphoryliert Akt an Threonin 308, aber Akt kann auch an Serin 473 phosphoryliert werden. In verschiedenen Studien wurde versucht eine Kinase zu finden, die an der selben Stelle in den PI3K-Weg integriert ist, wie PDK1, aber einen anderen Phosphorylierungsmechanismus besitzt. Dieses hypothetische Protein wurde PDK2 benannt, bislang steht der Beweis für dessen Existenz allerdings noch aus (Toker & Newton 2000).

In Drosophila stellt PDK1 einen lebensnotwendigen Faktor in der Embryonalentwicklung dar. PDK<sup>-/-</sup> Fliegen entwickeln sich nicht zu einem erwachsenen Tier, sondern sterben während der Embryonalentwicklung. Organspezifische Überexpression im Auge führte zu deutlich (etwa 1,3-fach) vergrößerten Sehzellen (Cho et al. 2001). Auch PDK1 negative Mäuse sterben vor der Geburt spätestens am Tag 9,5 der Embryonalentwicklung. Mäuse, deren PDK1 Spiegel nur abgesenkt ist, sind bei der Geburt kleiner als ihre Geschwister und morphometrische Untersuchungen an der Nebenniere zeigten, dass mindestens an diesem Organ die Reduktion durch eine selektive Verkleinerung der Zellen ohne eine Veränderung der Zellzahl bedingt ist. Eine Untersuchung der nachgeschalteten Kinasen von PDK1, Akt und S6K ergab keine Veränderung in deren Aktivität (Lawlor et al. 2002).

#### 2.4.1.1.4 PDK abhängige Signalmoleküle

##### *Protein Kinase B (PKB / Akt)*

Protein Kinase B (PKB) wird auch als Akt bezeichnet, da es homolog zum viralen Onkogen v-akt ist. Normalerweise liegt Akt im Zytosol vor, aber nach Aktivierung z.B. durch PDK wandert es an die Zellmembran und anschließend in den Zellkern (Andjelkovic et al. 1997). Akt enthält eine Pleckstrin-Homologie (PH) Domäne, die eine Bindung an 3-Phosphoinositide

ermöglicht. Studien haben gezeigt, dass PDK1 die Aminosäure Threonin an der Position 308 (Thr 308) in PKB/Akt phosphoryliert (Toker & Newton 2000). Dies scheint der Schlüsselmechanismus für die Weiterleitung von vielen Wachstumssignalen durch den PI3K-Weg zu sein. Organspezifische Deletionen am Auge und am Flügel bei *Drosophila* führten zu einer Verkleinerung der betroffenen Zellen. Da im Auge neben normalen Zellen auch verkleinerte vorhanden waren, kann man davon ausgehen, dass Akt nur autonom auf die Zelle wirkt, und keine Signale an Zellen im Zellverband weitergegeben werden (Verdu et al. 1999). Durch Überexpressions- und Knockout Versuche in Mäusen wurden unter anderem GSK3, S6K, FKHR und auch mTor als Targets von Akt identifiziert (Shioi et al. 2002).  $\beta$ -Zellspezifische Überexpression von Akt führte zu einer deutlichen Vergrößerung der Zellen und einer gleichzeitigen Abnahme der Zellzahl. Diese Befunde gingen einher mit einer erhöhten Insulinsekretion (Tuttle et al. 2001).

#### *Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)*

Ein bisher unbekannter Mechanismus führt zur Aktivierung von mammalian Target of Rapamycin (mTOR), was dann wiederum zu einer erhöhten Phosphorylierung von Initiations Faktor 4E Bindungsprotein (4E-BP1) und S6 Kinase führt. In der Maus scheint mTOR im, Gegensatz zu *Drosophila*, keinen Effekt auf die Zellgröße zu haben. MTOR Mutanten weisen jedoch eine abnormale Proliferation auf (Hentges et al. 2001). Die Wirkung von mTOR kann durch Rapamycin, einen chemischen Immunsuppressor, unterdrückt werden, wodurch eine spezifische Untersuchung der Funktionen von mTOR ermöglicht wird. In der Zellkultur macht sich eine Unterdrückung von mTor durch Rapamycin in einer deutlichen Abnahme der Zellgröße bemerkbar (Fingar et al. 2002). Diese Untersuchung zeigt, dass Zellkulturuntersuchungen nicht immer mit *in vivo* Untersuchungen übereinstimmende Ergebnisse bringen. In Hefen oder Zellkultursystemen ist die Wirkung von mTOR abhängig von den verfügbaren Nährstoffen, aber auch in höheren Lebewesen weist die Regulation von IRS-1 durch mTOR auf einen Zusammenhang zwischen der Nährstoffbalance und einem normalen Wachstum hin (Fisher & White 2004).

#### *Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3)*

GSK3 wird durch Phosphorylierung inaktiviert. Akt ist eine der möglichen Kinasen, die GSK3 phosphorylieren. Ursprünglich wurde GSK3 als ubiquitär exprimierte Serin Threonin Kinase identifiziert, welche die insulininduzierte Glykogen Synthese reguliert (Welsh et al. 1996). GSK3 phosphoryliert die Glykogen Synthase und führt so zu einer Inaktivierung der Glykogen Synthase. Die Anwesenheit von Insulin führt zu einer Inhibierung von GSK3 und

damit zur Dephosphorylierung und Aktivitätssteigerung der Glykogen Synthase (Woodgett et al. 1993). Gleichzeitig ist GSK3 am Wnt-Signalweg bei *Drosophila*, *Xenopus* und Säugetieren beteiligt (Nusse 1997). Der Wnt Signalweg spielt vor allem bei der embryonalen Entwicklung eine Rolle, Veränderungen werden aber auch in verschiedenen Tumorerkrankungen beobachtet (Nusse 1997).

#### *S6Kinase (S6K)*

S6K ist die einzige bislang bekannte Komponente aus dem PI3K-Weg, die nur die Zellgröße, aber nicht die Zellzahl beeinflusst (Montagne et al. 1999). Die Kinase aktiviert Translation durch die Phosphorylierung von 40S ribosomal Protein S6 (Stewart & Thomas 1994). Dabei werden Gene für Komponenten des Translationsapparates, einschließlich ribosomaler Proteine und Elongationsfaktoren angeschaltet (Dufner & Thomas 1999). In *Drosophila* kontrolliert S6K Zellgröße, Wachstum und Proliferation (Montagne et al. 1999). In der Maus konnte durch die Deletion von S6K nur eine Reduktion der Größe identifiziert werden, aber keine Änderung der Phosphorylierung von 40S ribosomal Protein S6 und keine Änderung der Genaktivität. Das führte zur Entdeckung von S6K2, das zu 70 % mit S6K1 identisch ist. Offensichtlich ist S6K2 in der Lage einige Funktionen von S6K1 zu übernehmen (Shima et al. 1998). Beide S6Kinasen werden unter anderem durch PDK1 aktiviert (Martin et al. 2001).

#### *Forkhead in rhabdomyosarcoma (FKHR)*

FKHR zählt zur Familie der Forkhead Transkriptionsfaktoren. Die Aktivität von FKHR wird durch Akt gehemmt, in dem es veranlaßt wird den Zellkern zu verlassen (Junger et al. 2003). Eine solitäre Mutation von FKHR Transkriptionsfaktor führte zu einer höheren Stressanfälligkeit. Erst durch zusätzliche Mutationen im IR Signalweg zeigte sich, dass FKHR in der Lage ist Veränderungen der Zellzahl auszugleichen, jedoch nicht der Größe (Junger et al. 2003). Durch eine zweite Gruppe, die mit einem Überexpressionsmodell arbeitete, konnte kein getrennter Einfluss auf Zellgröße und -zahl festgestellt werden. Die Überexpression führte zu einer Steigerung von beiden Parametern (Kramer et al. 2003).

### **2.4.2 Weitere IGF-induzierte wachstumsrelevante Mechanismen**

Neben dem PI3K-Weg gibt es noch weitere IGFIR abhängige Mechanismen, die Einfluss auf die Zellgröße und Zellzahl nehmen.

#### 2.4.2.1 Mitogen aktivierte Protein Kinase Wege (MAPK-Wege)

Die MAPK-Wege zählen zu den Signalmechanismen, die unter anderem auch durch den IGFIR induziert werden. Mitogen aktivierte Protein Kinasen (MAPK) spielen in vielen Signaltransduktionswegen eine Rolle. Der IGFIR kann der Ausgangspunkt ihrer Signalweiterleitung sein, aber auch andere RTKs, wie z.B. der EGFR und der PDGFR lösen MAPK Signalwege aus. Bei den Säugetieren teilt man die MAPK in drei große Familien ein: Extrazelluläre-Signal regulierte Kinasen (ERKs), c-Jun NH<sub>2</sub>-terminale Kinasen (JNK) und p38 MAPK (Biondi & Nebreda 2003). Ras ist ein G-Protein, das z.B. Raf aktivieren kann. Raf (MapKKK) liegt im ERK-Signalweg über ERK, kann aber auch Einfluß auf PI3K ausüben und Ral-GDS Proteine aktivieren. Auch eine Aktivierung von JNK ist z.B. in Kardiomyozyten möglich (Ramirez et al. 1997). ERK nimmt abhängig vom Zellsystem Einfluss auf Differenzierungsprozesse, Proliferation und Zellerhaltung, das bedeutet, dass die Funktionen von ERK abhängig vom Kontext sind (Wilson 1994). Transgene Tiere mit gezielten Veränderungen im Raf/ERK Signalweg in der Herzmuskulatur zeigen hypertrophische Veränderungen am Herzen (Bueno et al. 2000). Allerdings führt eine Veränderung von Ras, einem im Signalweg weiter oben gelegenen G-Protein, in den Herzmuskelzellen nicht zu einer Hypertrophie, sondern zu pathologischen Umbauvorgängen (Hunter et al. 1995). Der JNK Signalweg wurde als wichtiger Faktor in der Präimplantationsphase der Maus identifiziert. JNK und auch p38 MAPK spielen eine wichtige Rolle bei der Blastozystenbildung (Brancho et al. 2003; Maekawa et al. 2005). Aber auch zu späteren Zeitpunkten spielt der JNK Signalweg eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung. Ohne funktionsfähiges JNK bleibt der Rückenmarkkanal offen (Goberdhan & Wilson 1998). Heruntergesetzte p38 MAPK Aktivität führt in Mäusen zu einer verminderten Wachstumskontrolle und vermehrten Tumorentstehung (Brancho et al. 2003).

### 2.5 Andere wachstumsrelevante Signalwege und Faktoren

Neben den RTK abhängigen Signalwegen gibt es eine ganze Reihe weiterer Liganden-Rezeptor-Systeme, die direkt oder indirekt Einfluss auf die Wachstumsregulation nehmen. Eine bedeutende Rolle spielt dabei sicher der direkte Einfluss von GH über den GHR auf die Zelle.

### 2.5.1 GHR Signaltransduktion

Seine Wirkung auf die Zelle übt GH über den GH Rezeptor (GHR) aus. Dabei handelt es sich um einen Typ 1 Zytokin Rezeptor. Typisch für Rezeptoren aus dieser Familie ist, dass sie nur eine einzelne membrandurchspannende Domäne besitzen (Cosman et al. 1990). Die Bindung von GH führt zur Dimerisierung des Rezeptors (Zhang et al. 1999). Da Zytokin Rezeptoren keine eigene Kinaseaktivität besitzen, aktivieren sie zunächst eine intrazelluläre Kinase, um Signale weiterzugeben (Liu et al. 1998). Das Hauptsubstrat des aktivierten GHR ist die Tyrosin Kinase Janus Kinase 2 (JAK2) (Dinerstein et al. 1995; Wang et al. 1995). JAK2 bildet einen Komplex mit der intrazellulären Domäne des GHR (Argetsinger et al. 1993). Die Aktivierung des Rezeptors führt durch JAK2 zur Phosphorylierung des Rezeptors und damit zur Bereitstellung von sogenannten „docking sites“ sowohl am Rezeptormolekül als auch an der Kinase. Zu diesen Substraten zählen unter anderem IRS (Yamauchi et al. 1998), die p85 Untereinheit von PI3K (Moutoussamy et al. 1998), Suppressor of Cytokine Signaling 1-7 (SOCS) (Hansen et al. 1999), Epidermal Growth Factor Rezeptor (Yamauchi et al. 1997) und Signal Transducers and Activators of Transcription-1, -3, -5a und 5b (STAT-1, -3, -5a und 5b) (Sotiropoulos et al. 1996). Auch die Aktivierung von FAK ist beschrieben worden und in diesem Zusammenhang wird ein IRS unabhängiger Aktivierungsmechanismus für PI3K diskutiert (Zhu et al. 2001a). Der MAPK Weg kann auch direkt durch GH (über Shc Phosphorylierung, Grb2, Sos, Ras, Raf und MEK) aktiviert werden (VanderKuur *et al.* 1995). Am besten beschrieben ist die Signalweiterleitung von JAK2 auf die STATs (Carter-Su & Smit 1998). Nach Phosphorylierung wandern die STATs in den Zellkern und lösen dort an spezifischen Genabschnitten Transkription aus. Unter den direkten und indirekten Zielgenen der STATs sind die Gene für Suppressor of Cytokine Signaling 1-7 (SOCS) und IGF-I. SOCS wirken als Inhibitoren des GHR Signalweges, indem sie an JAK2 binden und so die Signalweiterleitung unterbrechen. Das bedeutet, dass sich der GHR Signalweg über seine eigene Transkriptionskontrolle regulieren kann (Starr & Hilton 1999). Eine Ausschaltung von SOCS2 führt zu einer organspezifischen Zunahme von IGF-I, also gibt es auch auf dieser Ebene eine Verbindung zwischen den GHR Signalwegen und den IGFIR Signalwegen. Der einzige bisher beschriebene JAK2 unabhängige Mechanismus des GHR ist die Regulation des Calciumeinstroms über L-Typ Calcium Kanäle (Billestrup et al. 1995).

## **2.6 Die Nebennieren**

### **2.6.1 Entwicklung, Anatomie und Funktion der Nebennieren**

Im Embryo entwickeln sich die Nebennieren (Glandulae suprarenales) aus zwei unterschiedlichen Anteilen. Die Nebennierenrinde entwickelt sich aus dem mesodermalen Zölom, während die Markzone aus der ektodermalen Neuralleiste entsteht. Im Gegensatz zu den Fischen vereinigen sich bei den Säugetieren diese beiden Anteile während der Embryonalentwicklung (Liebich 1993). Bei den Nebennieren handelt es sich um ein paariges Organ. Sie sind am vorderen Pol der Niere lokalisiert, ohne mit dieser über Gefäße in Verbindung zu stehen. Auch funktional sind die Nebennieren unabhängig von den Nieren. Sie besitzen ein Mark, welches für die Produktion der Stresshormone Adrenalin und Noradrenalin zuständig ist, und eine Rinde, die sich in drei histologisch und funktional unterschiedliche Zonen aufteilt. Von innen nach außen unterscheidet man eine Zona retikularis, Zona fasciculata und Zona glomerulosa. In der Zona retikularis werden Sexualhormone, wie Östrogen und Androgen gebildet. In der Zona fasciculata werden die Glukokortikoide Kortisol und Kortison gebildet, die eine wichtige Rolle beim Fett-, Kohlenhydrat- und Eiweißstoffwechsel spielen und zudem eine suppressive Wirkung auf das Immunsystem haben. Die Zona glomerulosa ist für die Bildung der Mineralokortikoide, vor allem Aldosteron, zuständig. Dieses Hormon dient der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes durch Steuerung des Natrium- und Kaliumspiegels. Aldosteron beeinflusst zudem über das Renin-Angiotensin-System der Niere den Blutdruck (Liebich 1993). Eine deutliche Abnahme der Mitosen von jungen Mäusen (15-17 Tage) zu erwachsenen Tieren gibt einen deutlichen Hinweis darauf, dass die erwachsene Nebenniere keinen deutlichen Proliferationsvorgängen mehr unterworfen ist (Whitehead, 1933). Markierungsversuche bestätigten die bereits frühe These, dass in der Nebenniere Proliferationsvorgänge durch zentripetale Bewegungen der Zellen reguliert werden. Eine Untersuchung der Nebennieren nach einer Einlagerung von markiertem Thymidin zeigte, dass sich entsprechend dem Zeitverlauf die markierten Zellen von der Zona glomerulosa zum Mark hin bewegten (BRENNER 1963).

### **2.6.2 Regulation des Nebennierenwachstums**

ACTH ist ein wichtiger Regulator für das Nebennierenwachstum. Durch ACTH wird sowohl das Gewicht der Nebennierenrinde determiniert als auch die Steroidsynthese reguliert (Bland

et al. 2000). Eine Reihe von weiteren Transkriptionsfaktoren wurde ebenfalls als relevant für die Entwicklung der Nebennierenrinde identifiziert (Hammer et al. 2005). Darunter hat SF-1 sicher eine wichtige Rolle. SF-1 übt seine Wirkung offensichtlich durch sehr spezifische Mechanismen aus. Die spezifische Expression von SF-1 in steroidproduzierenden Geweben wurde durch transgene Mäuselinien ermittelt, die das GFP Gen unter der Kontrolle des SF-1 Promoter integriert haben. SF-1 ist während der Embryonalentwicklung in gonadalem und adrenalem Gewebe nachweisbar und sogar eine Trennung zu einem späteren Zeitpunkt in Mark und Rinde ist an der SF-1 Expression erkennbar (Hatano et al. 1994; Ikeda et al. 1994). Homozygote SF-1 Knockout Mäuse zeigen bei der Geburt keine äußeren Auffälligkeiten, aber sie sterben kurz nach der Geburt an Gluko- und Mineralokortikoidmangel. Durch Injektionen der Kortikoide kann das Überleben gesichert werden (Luo et al. 1994). Bei einer einseitigen Adrenalectomie ist SF-1 an der Entwicklung der Hyperplasie und Hypertrophie der verbleibenden Nebenniere beteiligt, denn in SF-1 +/- Mäusen findet kein ausgleichendes Wachstum der zweiten Nebenniere statt (Beuschlein et al. 2002). Ob SF-1 auch eine Rolle bei GH induzierter Hypertrophie und Hyperplasie spielt ist noch nicht untersucht.

### **2.6.3 Anatomische Besonderheiten der Nebenniere der Maus**

Die Maus unterscheidet sich durch einige anatomische Besonderheiten von anderen Säugetieren. Bei der Maus sind unter dem Lichtmikroskop nur die Zona fasciculata und Zona glomerulosa unterscheidbar. Die Zona reticularis und die Zona fasciculata erscheinen gleich. Zudem findet man bei jungen Tieren noch eine Zone X, die aus kleinen Zellen besteht und zwischen Rinde und Mark liegt. Bei der männlichen Maus verschwindet diese Zone mit Erreichen der sexuellen Reife, bei der weiblichen Maus mit der ersten Trächtigkeit. Bei Weibchen ohne Trächtigkeit bildet sie sich langsam zurück (Firth 1983). Es wird vermutet, dass diese Zone der fetalen Nebennierenrinde entspricht, die man auch beim Menschen findet und die sich dort mit der Geburt zurückbildet (Anderson und Capen 1978).

## **2.7 Die Untersuchung der Genexpression auf der Ebene der mRNA**

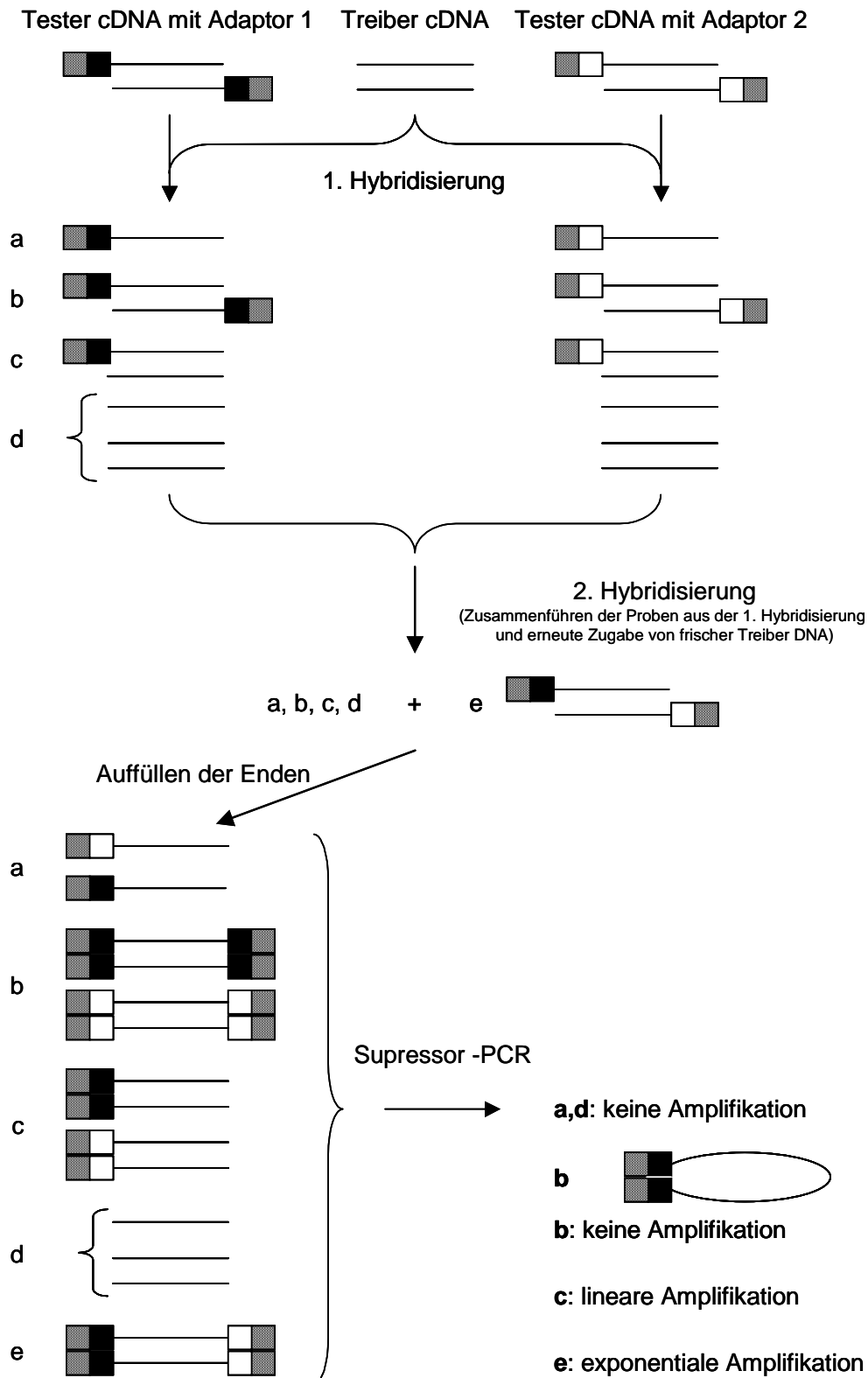
In jeder Zelle eines Organismus liegt bis auf wenige Ausnahmen immer das gleiche, vollständige Genom vor. Erst das spezifische Aktivitätsmuster der Gene bestimmt den jeweiligen Differenzierungs- und Entwicklungszustand einer Zelle. Die zeitlichen und räumlichen Aktivitätsmuster der Gene bestimmen letztendlich auch den Aufbau und die Größe von Organen und Organismen. Daher kann eine systematische Analyse der Genexpression auf der Ebene der mRNA (=Transkriptom) in einem geeigneten

Untersuchungssystem Aufschlüsse darüber geben, wie beispielsweise Prozesse wie Wachstum und Zellteilung reguliert werden. Mit der Entwicklung von Hochdurchsatztechnologien in der Genforschung entstanden Verfahren, wie z.B. Microarray-Technologie (Skena et al. 1995), die in der Lage sind, das Expressionsniveau tausender Gene parallel zwischen verschiedenen Zellen oder Geweben zu vergleichen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Kombination aus sogenannten subtraktiven cDNA-Bibliotheken und der Microarray-Technologie verwendet. Damit können differentiell exprimierte Gene besonders effektiv identifiziert werden (Yang et al. 1999). Mit Hilfe der subtraktiven Hybridisierung werden cDNAs von differentiell exprimierten Genen angereichert und in Form einer cDNA-Bibliothek kloniert. Eine besonders effiziente Form dieser Methode ist das sogenannte Suppression Subtractive Hybridization (SSH) Verfahren (Diatchenko et al. 1996), mit dem je nach Untersuchungssystem ein Anreicherungsgrad von 90 % erzielt werden kann (Diatchenko et al. 1996). Abbildung 3 zeigt schematisch den Ablauf des Verfahrens. Die „Tester“-cDNA entspricht der cDNA-Population, aus der die cDNAs differentiell exprimierter Gene angereichert werden. Die „Treiber“-Population wird von der „Tester“-Population abgezogen. Der erste Schritt der subtraktiven Hybridisierung findet in zwei getrennten Ansätzen statt, die sich dadurch unterscheiden, dass mit unterschiedlichen Adaptoren versehene „Tester“-cDNA eingesetzt wird. Die „Treiber“-cDNA wird im hohen Überschuss zugegeben, um die Hybridisierung mit der „Tester“-cDNA zu beschleunigen. Während der subtraktiven Hybridisierung findet auch gleichzeitig eine Normalisierung statt. Das bedeutet, dass sich „Tester“-Moleküle je nach Konzentration auch selbst finden und miteinander hybridisieren können, da für die subtraktive Hybridisierung doppelsträngige cDNA verwendet wird. Das bewirkt, dass später in der subtraktiven Bank cDNAs von stark und differentiell exprimierten Genen nicht zu sehr überrepräsentiert sind und auch cDNAs von schwach, aber differentiell exprimierten Genen angereichert werden. Beim zweiten Schritt der Hybridisierung werden die beiden Ansätze zusammengegeben. Nun können bisher einzelsträngig gebliebene „Tester“-Moleküle zum Doppelstrang hybridisieren. Dies sind vor allem solche cDNA Moleküle, die in der „Treiber“-Population nicht vorhanden sind oder eine deutliche niedrigere Konzentration aufweisen. In der anschließenden PCR werden doppelsträngige „Tester“-Moleküle amplifiziert, die an ihren Enden verschiedene Adaptoren tragen (Adaptor 1 und Adaptor 2). Alle anderen Moleküle werden gar nicht oder nicht exponentiell amplifiziert. Durch den sogenannten „Suppressor“-Effekt, der dem Verfahren den Namen gab, werden auch solche doppelsträngigen „Tester“-Moleküle nicht amplifiziert, die an ihren Enden gleiche Adaptoren tragen. Dadurch wird erst die Normalisierung während der ersten Hybridisierung ermöglicht.



Die PCR-Produkte werden anschließend in einen geeigneten Plasmid-Vektor kloniert und damit die subtraktive cDNA-Bibliothek erstellt. Da in den meisten Fällen nur eine bestimmte Anreicherung der cDNAs von differentiell exprimierten Genen erzielt wird, wird ein Verfahren benötigt, um diese cDNAs in der subtraktiven cDNA-Bibliothek unter dem Hintergrund an nicht differentiell exprimierten Genen zu identifizieren. Ideal dafür geeignet ist die cDNA-Array-Hybridisierung oder auch Microarray-Hybridisierung genannt. Dabei werden die klonierten cDNA-Fragmente von einigen tausend cDNA-Klonen via PCR amplifiziert und auf einen festen Träger gedruckt (Bauersachs et al. 2003; Bauersachs et al. 2004; Bauersachs et al. 2005; Diehl et al. 2005). Anschließend werden diese identischen Arrays mit den komplexen cDNA-Proben aus den zu untersuchenden Zellen oder Geweben hybridisiert. Die erhaltenen Signalmuster spiegeln die Expressionsniveaus der entsprechenden Gene wider. Werden unterschiedlich starke Signale mit den zu vergleichenden Proben für eine bestimmte cDNA erhalten, wird diese sequenziert, um sie zu identifizieren. Im Idealfall wird je nach Untersuchungssystem eine unterschiedliche Anzahl an differentiell exprimierten Genen identifiziert, die Ausgangspunkt für weitere vertiefende Untersuchungen sein kann.

Die Methode besitzt einige Vorteile im Vergleich zu anderen Subtraktionsverfahren. Es werden relativ kurze cDNA-Moleküle ( $< 2000$  kb) für die Hybridisierung eingesetzt, die eine verbesserte Hybridisierungskinetik gewährleisten. Durch die Normalisierung können auch differentielle cDNAs erfasst werden, die seltener sind. Die Anreicherung der cDNAs differentiell exprimierter Gene erfolgt durch eine Suppressor-PCR, wodurch die unerwünschten Produkte nicht mehr abgetrennt werden müssen. Desweiteren wird vergleichsweise wenig poly(A)<sup>+</sup>-RNA als Ausgangsmaterial benötigt, was von Bedeutung ist, wenn das zu untersuchende Material limitierend ist.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Ablaufs der Suppression Subtractive Hybridisation (SSH)-Methode. Bildliche Darstellung in Anlehnung an das Modell von Diatchenko et al. 1996**

Eine Validierung der gefundenen differentiell exprimierten cDNAs mit Hilfe anderer Verfahren ist bei geringeren Unterschieden sinnvoll.

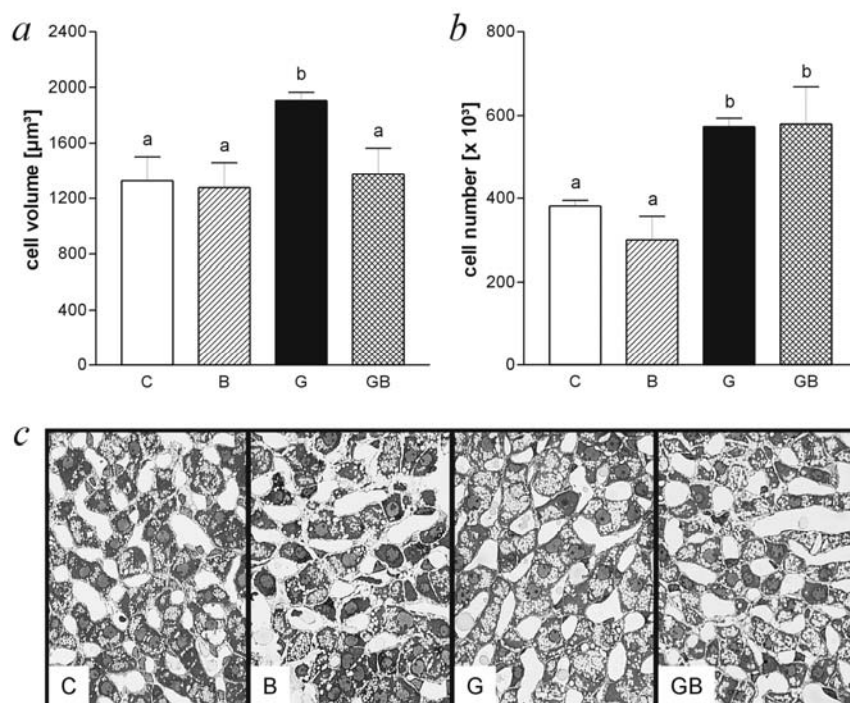
## 2.8 Vorarbeiten und Zielsetzung

Ausgangspunkt für die vorliegende Dissertation war ein transgenes Tiermodell zur differentiellen Analyse der Kontrolle von Zellzahl und Zellgröße (Hoeftlich et al. 2002). Das Modell war in Kooperation zwischen dem Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und dem Institut für Tierpathologie etabliert worden.

Im Tiermodell wurden weibliche hemizygote IGFBP-2-transgene Mäuse mit männlichen hemizygoten PEPCK-bGH-transgenen Mäusen verpaart, wobei vier verschiedene genetische Gruppen von Nachkommen erhalten werden. Tiere, die beide Genotypen tragen (GB), GH-transgene Tiere (G), IGFBP-2-transgene Tiere (B) und nichttransgene Tiere (C), die als Kontrollen verwendet werden. Die Mäuse zeigten ab einem Alter von drei Wochen genotypspezifische Gewichtsunterschiede, wobei die GH-transgenen Tiere deutlich schwerer werden als ihre nichttransgenen Geschwister. Dieser Effekt wurde durch die Koexpression von IGFBP-2 reduziert, allerdings nicht vollständig aufgehoben. Die IGFBP-2-transgenen Tiere waren deutlich leichter. Diese Unterschiede bleiben auch in den adulten Mäusen bestehen. Bei den Nebennieren hoben sich im Alter von 5 Wochen nur die GH-transgenen Tiere mit einer deutlichen Erhöhung des Nebennierengewichtes ab. Die Tiere der anderen zwei transgenen Gruppen im Alter von 5 Wochen zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Gewicht ihrer Nebennieren, im Vergleich zu nichttransgenen Kontrolltieren. Im Alter von 4 Monaten wurden weitere Unterschiede deutlich, wobei die Nebennieren der IGFBP-2-transgenen Tiere das geringste Gewicht hatten und die Koexpression von IGFBP-2 in den doppeltransgenen Mäusen zwar nicht mehr zu einer völligen Angleichung an die Gruppe der Kontrollen führte, aber die Gewichtsreduktion zu den GH-transgenen Tieren deutlich höher ausfiel als bei den IGFBP-2-transgenen Tieren im Vergleich zur Kontrolle. Die wachstumshemmende Wirkung von IGFBP-2 ist unter erhöhten GH/IGF-I Konzentrationen signifikant stärker ausgeprägt, als unter normalen GH/IGF-I Konzentrationen. Bei Bestimmungen des Volumens der einzelnen Nebennierenanteile wurde festgestellt, dass sowohl Mark als auch Rinde durch die GH-Überexpression vergrößert waren und auch beide Anteile durch die Koexpression von IGFBP-2 beeinflusst wurden. Um festzustellen, ob eine Hyperplasie oder eine Hypertrophie für die Größenzunahme der Nebenniere in den GH-transgenen Tieren verantwortlich ist, wurden in der Zona fasciculata stereologische Untersuchungen durchgeführt. Daraus ergab sich, dass die Größenzunahme sowohl durch eine Hyperplasie als auch eine Hypertrophie der Zellen bedingt war. Erstaunlicherweise zeigten die doppeltransgenen Tiere keine Verminderung der Zellzahl im Vergleich mit den GH-transgenen Tieren, lediglich die Zellgröße war auf das Maß der Kontrolltiere reduziert

(Abbildung 4). Aus diesen Untersuchungsergebnissen kann man vermuten, dass IGFBP-2 in Zellen der Zona fasciculata eine Signalkaskade in Gang setzt, die sich selektiv auf das Größenwachstum, aber nicht auf die Proliferationsrate auswirkt.

Es gibt mehrere Gründe, die Nebennieren im Zusammenhang mit einer Expression von IGFBP-2 zu untersuchen. IGFBP-2 ist mit IGF-II koreguliert, was einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung der Nebennierenzellen und auf die Produktion von Steroiden ausübt (Weber et al. 1999). Im Zusammenhang mit Nebennierenkarzinomen beobachtet man häufig einen Anstieg des IGFBP-2 Serumspiegels (Boulle et al. 1998) und die Überexpression von IGFBP-2 in Nebennierenrindentumorzellen führte zu einer Zunahme der Malignität dieser Zellen (Hoeflich et al. 2000).



**Abbildung 4:** Zona fasciculata Zellen der Nebennierenrinde weisen in GH-transgenen Mäusen (G) sowohl ein vergrößertes Zellvolumen (a), als auch eine erhöhte Zellzahl (b) auf. Durch die Koexpression von IGFBP-2 in GH transgenen Mäusen (GB) wird das Zellvolumen normalisiert, nicht jedoch die Zellzahl. Die Graphen zeigen die Mittelwerte mit Standardabweichung von Zellvolumen und Zellzahl von Zona fasciculata Zellen in 11 Wochen alten Mäusen. Die Graphik darunter zeigt repräsentative Ausschnitte von histologischen Schnitten der Nebennierenrinde (Abbildung entnommen aus (Hoeflich et al. 2002)).

In der vorangegangenen Studie wurde zusätzlich als Funktionsparameter der Nebenniere und im Besonderen der Zona fasciculata der basale und ACTH-induzierte Plasmaspiegel von Kortikosteroiden bestimmt. Dieser war bei den GH-transgenen Tieren dreimal so hoch wie bei den Kontrolltieren. Der Unterschied zwischen den doppeltransgenen Tieren und den Kontrolltieren betrug nur 40 %, allerdings war er auch um 47 % niedriger als bei den GH-transgenen Tieren, also kann man vermuten, dass die Kortikosteroidsekretion mit der Zellgröße korreliert ist.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand in einer

1. Transkriptomuntersuchung zur Klärung, ob zwischen den GH transgenen und den doppeltransgenen Mäusen in den Nebennieren Unterschiede in der Expression von Genen, die für die Zellgrößenregulation verantwortlich sein könnten, auf mRNA-Ebene nachweisbar sind.
2. Spezifischen Analyse wachstumsrelevanter Signalkaskaden zur Charakterisierung der Signaltransduktion in unserem Modell.
3. Erweiterung der funktionalen Wachstumsanalyse in den Nebennieren durch stereologische Untersuchungen in 38 Tage alten Mäusen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

7000 Sequence Detection System ABI PRISM	Applied Biosystems, Darmstadt
Analysenwaage AE 200	Mettler, Schweiz
Analysenwaage Mettler AE 200	Mettler Toledo GmbH, Giessen
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Automatische Pipette EDOS 5222	Eppendorf, Hamburg
Automatischer Sequenzierer ABI PRISM <sup>TM</sup> 377	PE Applied Biosystems, Darmstadt
Certomat®H	B. Braun Biotech International, Melsungen
Crosslinker	Spectrolinker, Albany, NY, USA
Gewebe-Homogenisator (Art-Micro D8)	ART Labortechnik, Mühlheim
Illuminator Eagleeye II	Stratagene, Heidelberg
Kodak Image Station 440	Rochester, NY, USA
Kühlthermostat F3-CH	Haake, Lisons
Magnetrührer Ikamag® RCT	Ika Labortechnik, Staufen
Mehrkanalpipetten	Eppendorf / Gilson
Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Microarray Spotter Omnigrid Accent	Gene Machines, San Carlos, CA, USA
Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Oberkochen
Mikrowelle 8521	Privileg
Milliblot-Graphite Elektrobloetter	Millipore, Bedford, MA, USA
Phosphorimager Storm 860	Molecular Dynamics
Powersupply POWER PAV 300	BioRad, München
Powersupply PPS 200-1D	MWG-Biotech, Heidelberg
Rock'n Roller	Breda
Schüttler KS 250 basic	Ika Labortechnik, Staufen

Solid pins (SSP015) für Omnigrid Accent	Telechem International, Sunnyvale, CA, USA
Stereolupe, Stemi DV 4	Zeiss, Oberkochen
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Video®Image Analysis System	Zeiss, Oberkochen
Vortex Genie 2	Scientific Industries, INC., NY, USA
Waage PM 3000	Mettler, Schweiz
<i>Gelelektrophorese-Apparaturen</i>	
Gibco BRLHorizontal Gel	Life Technologies, Rockville MD, USA Harnischmacher, München
<i>PCR Geräte</i>	
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermocycler UnoII	Biometra, Göttingen
<i>Hybridisierungsöfen</i>	
VT 5042EK	Heraeus, Langenselbold Kendro, Langenselbold Bachofer, Reutlingen
<i>Zentrifugen</i>	
Micro Centrifuge II	Neolab, Heidelberg
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5417	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge GS-15R	Beckman, München
<b>3.1.2 Chemikalien</b>	
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
30 % Acrylamid/Bis Solution (29:1)	BioRad, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Äther (Narkose)	Merck, Darmstadt

Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloroform	Riedel-de Hâen, Deisenhofen
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (10mg/ml)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Fisch-Gelatine (RPN 416)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
GalX (50 mg/ml)	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Töpfer, Dietmannsried
N,N,N',N'-tetramethyldiamin (Temed)	Merck, Darmstadt
NaOH (2 N)	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	ICN, Irvine, CA, USA
NP-40 (Nonidet P 40)	Fluka, Deisenhofen
Ponceau-S	Sigma, Deisenhofen
RNAlater <sup>TM</sup>	Ambion, Huntingdon
Saccharose	Merck, Darmstadt
SeaKem LE® Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Trizol <sup>TM</sup> Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Tween-20 (Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat)	Sigma, Deisenhofen

### 3.1.3 Lösungen und Reagenzien

#### *Medien*

LB-(Luria-Bertani)-Medium	1 %	Trypton
	0,5 %	Hefeextrakt
	1 %	NaCl
	mit ca. 0,1 %	2 M NaOH auf pH = 7 bis 7,5



Für Agarplatten zusätzlich:	1,2 %	Agar
-----------------------------	-------	------

SOC-Medium	2 %	Trypton
	0,5 %	Hefeextrakt
	0,05 %	NaCl
	10 mM	MgCl
	10 mM	MgSO <sub>4</sub>
	0,4 %	Glucose

### *Lösungen und Puffer*

50 x TAE-Puffer (für 1 Liter)	242 g	Tris Base
	57,1 ml	Essigsäure
	37,2 g	Na <sub>2</sub> EDTA-Dihydrat

10 x TBE-Puffer	108 g	Tris Base
	55 g	Borsäure
	40 ml	0,5 M EDTA pH 8,0 ad 1 Liter Wasser

2,5 x Probenpuffer für Agarosegele (10 ml)	2,4 g	Harnstoff
	5 g	Saccharose
	1 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
	1 ml	1 % Bromphenolblau ad 10 ml Wasser

### PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, pH 7,5)

Lösung A	250 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,25 mM	NaCl
	250 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Lösung B	1,25 mM	NaCl    Lösung B

Lösung B wird zu Lösung A gegeben bis zum Erreichen des gewünschten pH-Wertes

TE-Puffer	10 mM	Tris/HCl, (pH 8,0)
	1 mM	EDTA
10 x Laufpuffer	30,3 g	Tris

	144,0 g	Glycin
	10,0 g	SDS
		ad 1000 ml Wasser
10 x Transferpuffer	58 g	Tris
	29 g	Glycin
	3,7 g	SDS
		ad 1000 ml Wasser
TBS	0,15 M	NaCl
	0,01 M	Tris pH 7,4 mit HCl
Elutionspuffer	62,5 mM	Tris pH 6,7 mit HCl
	2%	SDS
	100mM	2-Mercaptoethanol
2 x Probenpuffer für Microarray	40mM	Tris-HCl pH 8,4
	2 M	NaCl
	2mM	EDTA
	0,01%	Bromphenolblau
Glutaraldehyd	3% in PBS pH 7,4	
5x Lämmli	65,5 ml	1 M Tris (pH 6,8)
	100 ml	Glycerin
	2,0 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)
	20 g	SDS
	0,1 %	Bromphenolblau
		ad 200 ml Wasser
Probenextraktionspuffer für Proteine	80 ml	20 mM Tris pH 7,4
		2 % Triton X -100
	20 ml	5x Lämmli
Coomassiefärbelösung		

0,5 g	Coomassie Brilliant Blue R
800 ml	Methanol
140 ml	Essigsäure
Ad 2 l	Wasser

#### Coomassieentfärbelösung

400 ml	Methanol
70 ml	Essigsäure
	ad 1 l Wasser

#### Wasser

Für PCR-Reaktionen wurde autoklaviertes Reinstwasser nach Ultrafiltration (Milli-RO Plus 60, Millipore, Schwalbach) eingesetzt.

Für Reaktionen mit RNA wurde steril filtrierte (Filter Millex GP Porendurchmesser 0,22 µm) Reinstwasser verwendet.

Für Arbeiten mit Proteinen wurde immer Reinstwasser eingesetzt.

#### Reagenzien und Enzyme

Advantage cDNA Polymerase-Mix	BD Clontech, Heidelberg
Amperase GeneAmp®	Applied Biosystems, Darmstadt
AmpErase®Uracyl N-glycosylase (1 U/µl)	Applied Biosystems, Darmstadt
Co-precipitant seeDNA™	Amersham Pharmacia, Freiburg
DNA Ligase ( <i>E. coli</i> ) (10 U/µl)	Invitrogen, Karlsruhe
DNA Polymerase I ( <i>E. coli</i> ) (10 U/µl)	Invitrogen, Karlsruhe
DNase I (1 U/µl)	Invitrogen, Karlsruhe
ECL (enhanced chemoluminescence reagent RPN2109)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Erststrang-Puffer (5x) für cDNA	Invitrogen, Karlsruhe
High-Prime-Mix (5x)	Roche, Mannheim
Hotstar DNA Polymerase Kit	Qiagen, Heiden
Human COT-1 DNA (1 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Ligasepuffer für T4-Ligase (10x)	New England Biolabs, Beverly USA
Procasel 2%, Procainhydrochlorid	Selectavet, Weyarn-Holzolling
Proteinase K (20 mg/ml)	Boehringer, Mannheim
Qiagen Plasmid Miniprep Kit	Qiagen, Heiden

Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Heiden
QuantiTect™ Sybr® Green PCR Kit	Qiagen, Heiden
Random Hexamer Primers (3µg/µl)	Invitrogen, Karlsruhe
RNase-Inhibitor (40 U/µl) RNaseOUT™	Invitrogen, Karlsruhe
SuperScript™ II RNaseH <sup>-</sup> Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
SYBR Green PCR Master Mix	Qiagen, Hilden
Taq DNA Polymerase Kit	Qiagen, Heiden
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Transcriptase (200 U/µl)	Invitrogen, Karlsruhe
Wizard Kit	Promega, Madison, WI, USA
Zweitstrang-Puffer (5x) für cDNA	Invitrogen, Karlsruhe

### 3.1.4 Sonstiges Material

3-Wege-Hahn	Clinico, Bad Hersfeld
96-fach PCR-Reaktionsgefäße	ABgene, Hamburg
Dialyse-Membranen Millipore	Millipore, Schwalbach
Porendurchmesser 0,025µm Durchmesser 47 mm	
Einbettkassetten	Engelbrecht, Ederründe
Filter Millex GP Porendurchmesser 0,22 µm	Millipore Express, Irland
Gel-Blotting Papier GB002 / GB004	Schleicher & Schuell, Dassel
Heidelberger Verlängerung	Dispomed Witt oHG, Gainhausen-Hailer
Poly Q Vials 18 ml (Hybridisierungsgefäße)	Beckman, München
Infusionsschläuche	BD Infusion Therapy GmbH, Heidelberg
Kanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Klebefolie Adhesive PCR Foil Seals	ABgene, Hamburg
MicroSpin™ G-25 Columns	Amersham Biosciences, Freiburg
Mikrotiterplatten 384 well	Nalge Nunc International, NY
Nylon Transfer Membran (Porendurchmesser 0,45 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Omnifix 2 ml Luer Lock	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

PCR Gefäß 0,2 ml	G. Kisher GbR, Steinfurt
PCR Gefäßdeckel	G. Kisher GbR, Steinfurt
PCR Gummimatten Micro Amp Full Plate Cover	Perkin Elmer, Connecticut, USA
PVDF-Membran (Immobilon-P Transfermembran)	Millipore, Schwalbach
Reaktionsgefäße "safe lock" (2, 1,5, 0,5, 0,2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Spritze 20 ml	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen
Transportgefäß Rotilabo (5 ml)	Karlsruhe, Roth
Zellkultur Testplatte 96 well	TPP, Schweiz

#### *Verwendete Software*

AIDA Array Metrix	raytest, Straubenhardt
AIDA Array Compare	raytest, Straubenhardt
Primer Express	Applied Biosystems, Darmstadt
Axio Vision Release 4.2	Zeiss, Oberkochen
SAS Statistikprogramm	SAS Institute GmbH, Heidelberg

### **3.1.5 Oligonukleotide**

#### *Oligonukleotide für die Genotypisierung*

mIGFBP-2 sense	5'-GCG CGG GTA CCT GTG AAA-3'
mIGFBP-2 antisense	5'-TCC CTC AGA GTG GTC GTC ATC-3'
bGH sense	5'-CGG ACC GTG TCT ATG AGA AGC-3'
bGH antisense	5'-GGA AAG GAC AGT GGG AGT GG-3'

#### *Oligonukleotide für Sequenzierung und Kolonie-PCR*

T3	5'-ATTAACCCTCACTAAAG-3'
T7	5'-AATACGACTCACTATAG-3'
PM0	5'-CCAAATATCTCTCCCACCAGC-3'
T3ex	5'-TCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAG-3'
T7ex	5'-GTAATACGACTCACTAGGGC-3'
NLT7	5'-GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG G -3'
LT3	5'-CTC ACT AAA GGG AAC AAA AGC TG-3'

#### *Oligonukleotide für die RT-PCR*

PEX11-21se	5'-GCTCTGCTGAACCGTCTGG-3'
PEX11-69se	5'-GACCGCCTGATCCGGAC-3'
PEX11-255as	3'-GGCCATACTGCTTAGTG TAGACAAAC-5'
PEX11-477as	3'-TCTGTCTAAGCTTCAGCATTTGTCC-5'
PEX11-201as	3'-CAGTCCTGCAATGATTGAACTGG-5'
Prp4-73se	5'-CTCCTCCACGACAACCAAAAC-3'
Prp4-283se	3'-GCACATCAGTGAGCGGCAG-5'
Prp4-731as	3'-GACTGCAGAAATTATTCAAAGACCG-5'
Prp4-180as	3'-AGGCGTTCCCGCTCTTTC-5'
Prp4-488as	3'-TTAAGGCATCAGTCCCGACC-5'
ACTB-m-765se	5'-CTGCCGCATCTCTTCCTC-3'
ACTB-m-68se	5'-CACCAGTTCGCCATGGATG-3'
ACTB-m-887as	3'-CCATACCCAAGAAGGAAGGCTG-5'

### 3.1.6 Antikörper

Anti-rabbit IgG, HRP-linked (goat)	Cell Signaling Technology via New England BioLabs
Phospho-(Ser/Thr) Akt Substrate (polyclonal rabbit, IgG)	Cell Signaling Technology via New England BioLabs
Phospho-Akt (Thr308; polyclonal rabbitIgG)	Cell Signaling Technology via New England BioLabs
Phospho-PTEN (Ser380; polyclonal rabbit, IgG)	Cell Signaling Technology via New England BioLabs
Phospho-PDK1 (Ser241; polyclonal rabbit, IgG)	Cell Signaling Technology via New England BioLabs
Phospho-GSK-3 (Ser 21; monyclonal mouse, IgG)	Cell Signaling Technology via New England BioLabs
Phospho-mTOR (Ser 2448; polyclonal rabbit, IgG)	Cell Signaling Technology via New England BioLabs

### 3.1.7 DNA-Molekulargewichtstandards

#### *Molekulargewichtstandards für DNA:*

Ready-Load™ 1 Kb DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
Gene Ruler™ (100 bp DNA Ladder Plus: SM0321/2/3)	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Gene Ruler™ (100 bp DNA Ladder: SM0241/2/3)	MBI Fermentas, St. Leon Roth
pUC Mix Marker 8 (SM0301/2/3)	MBI Fermentas, St. Leon Roth

#### *Molekulargewichtstandard für Protein:*

Protein Molecular Weight Marker (SM0431)	MBI Fermentas, St. Leon Roth
--	------------------------------

### 3.1.8 Radiochemikalien

$\alpha$ -[ <sup>33</sup> P]-dCTP (2500 Ci/mmol)	Amersham Pharmacia, Freiburg
--	------------------------------

## 3.2 Versuchstiere

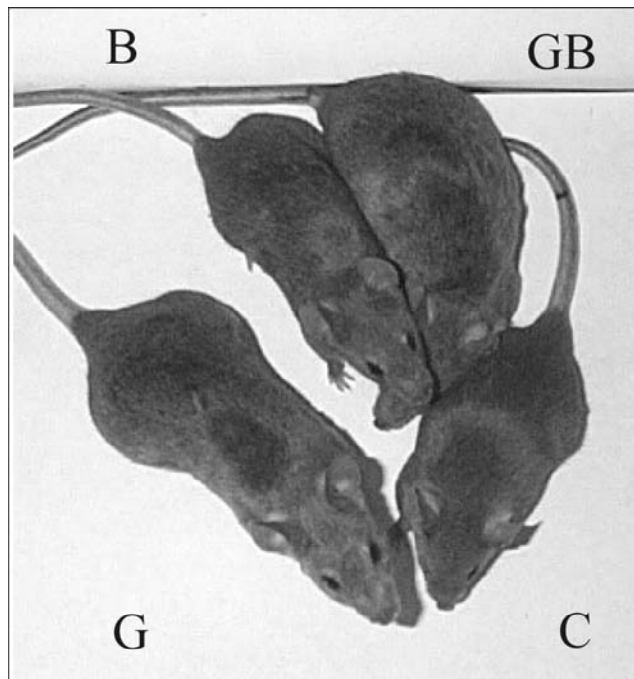
In der Arbeit kamen CMV-IGFBP-2-transgene Tiere (Hoeflich et al. 1999) sowie PEPCK-bGH-transgene Mäuse zum Einsatz. Das PEPCK-bGH-transgene Mausmodell war ursprünglich auf einem C57BL/6 X SJL Hintergrund erzeugt worden und wurde von Dr. T. E. Wagner, Edison Biotechnology Center, Ohio University, Athens, OH zur Verfügung gestellt. Die hemizygoten Mäuse, die für diese Studie verwendet wurden, wurden bis zur 12. Generation bei Charles River auf einen NMRI Hintergrund ausgezüchtet.

Weibliche hemizygote IGFBP-2-transgene Mäuse wurden mit männlichen hemizygoten PEPCK-bGH-transgenen Mäusen verpaart. Dadurch wurden vier verschiedene genetische Gruppen von Nachkommen erzeugt:

Tiere, die beide Genotypen tragen (GB), GH-transgene Tiere (G), IGFBP-2-transgene Tiere (B) und nichttransgene Tiere (C).

Alle Mäuse wurden unter nicht SPF (spezifiziert pathogen frei) konventionellen Bedingungen gehalten und hatten freien Zugang zu einem Standard-Nagerfutter (V1534, Ssniff, Soest) sowie Leitungswasser. Die Tiere wurden bis zu einem Alter von drei Wochen gemeinsam mit den Muttertieren in einer Gruppe gehalten und dann nach Geschlechtern getrennt abgesetzt. Für alle Untersuchungen wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet. Zum Zeitpunkt

des Absetzens wurden den Tieren unter Äthernarkose die letzten 2-3 mm des Schwanzes mit einer sterilen Schere entfernt, diese wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.



**Abbildung 5: Versuchstierkollektiv (Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. S. Nedbal)**

### **3.3 Methoden**

#### **3.3.1 Identifikation der Tiere**

##### **3.3.1.1 Isolierung von DNA aus Schwanzspitzen**

Die beim Absetzen gewonnenen Schwanzspitzen wurden zur Identifizierung des Genotyps des jeweiligen Tieres verwendet. Für die Genotypisierung wurde zunächst aus den Schwanzspitzen die DNA mit dem Wizard Kit von Promega nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Dafür wurden die Schwanzspitzen zunächst mit einem Puffer bei 56 °C mindestens 4 h oder maximal über Nacht proteolytisch verdaut, um die Zellen zu lysieren und die DNA zugänglich zu machen.



Zusammensetzung des Puffers:

120 µl	0,5 M EDTA pH 8,0
500 µl	Nuclei Lysis Buffer
17,5 µl	Proteinase K (20mg/ml)

Anschließend wurden die Gefäße auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt und 3 µl RNase A zugefügt. Durch vorsichtiges Schütteln wurde die verdaute Probe mit der RNase A vermischt und 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Protein Präzipitationslösung zugegeben und 20 s auf höchster Stufe mit dem Vortex Genie 2 gemischt. Nach einer Abkühlzeit von 5 min auf Eis wurden die Proben 4 min bei 15300 x g zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in neue Gefäße überführt, in welche bereits 600 µl Isopropanol vorgelegt worden war. Das Isopropanol diente der Fällung der im Überstand gelösten DNA. Das Gefäß wurde geschüttelt und ein weiteres Mal für 2 min zentrifugiert. Das entstandene DNA Pellet wurde einmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Nach vollständiger Trocknung wurde das Pellet in 100 µl Rehydration Solution gelöst und 1 µl davon für die genotypspezifische Polymerase Ketten Reaktion (PCR) verwendet.

#### 3.3.1.2 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die PCR dient der Vervielfältigung spezifischer DNA Fragmente. Als Primer werden kurze Oligonukleotide verwendet, die innerhalb der gewünschten Sequenz anlagern können. Um einen zur DNA komplementären Strang aufzubauen, wird die Polymerase des Bakteriums *Thermophilus aquaticus* verwendet. Diese Polymerase ist thermostabil, wodurch sich der Strangaufbau häufig wiederholen lässt, weil nach der Denaturierung ein erneutes Anlagern der Primer möglich wird. Auf diese Weise kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung des gewünschten DNA-Fragmentes. Alle PCR-Reaktionen, die für diese Arbeit durchgeführt wurden, wurden auf Eis angesetzt.

**Tabelle 1: Zusammensetzung einer Reaktion der IGFBP-2 PCR**

Komponenten	Menge [ $\mu$ l]
10x Puffer (Quiagen)	2
MgCl <sub>2</sub>	1,25
Q-Solution	4
1 mM dNTPs	2
mIGFBP-2 sense 2 $\mu$ M	2
mIGFBP-2 antisense 2 $\mu$ M	2
Wasser	5,7
HotstarTaq Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,1
DNA-Lösung	1
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20</b>

**Tabelle 2: Reaktionsbedingungen für die IGFBP-2 PCR**

Schritt	Temperatur in °C	Zeit in Minuten
1	94	4
2	94	1
3	54	1
4	72	2
Wiederholungen		35x ab Schritt 3
5	72	10

**Tabelle 3: Zusammensetzung einer Reaktion der PEPCK-bGH PCR**

Komponenten	Menge [ $\mu$ l]
10x Puffer	2
MgCl (25 mM)	1,25
1 mM dNTPs	2
BGH sense 2 $\mu$ M	1
BGH antisense 2 $\mu$ M	1
PCR Wasser	11,75
HotstarTaq Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,1
DNA	1
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20</b>

**Tabelle 4: Reaktionsbedingungen für die PEPCK-bGH PCR**

Schritt	Temperatur in $^{\circ}$ C	Zeit in Minuten
1	94	4
2	94	1
3	65	1
4	72	2
Wiederholungen		35x ab Schritt 3
5	72	10

### 3.3.1.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wird verwendet, um Nukleinsäuren nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen und anschließend sichtbar zu machen. Die PCR-Produkte werden in einem Gel, bestehend aus Agarose und Puffer, aufgetrennt. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wandern diese wegen ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode. Die Auftrennung der Nukleinsäuren nach ihrer Größe erfolgt aufgrund des

Molekularsieb-Effekts des Agarosegels. Die Wanderungsgeschwindigkeit verhält sich bei linearisierten doppelsträngigen Molekülen im Agarosegel umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts. Zur Bestimmung der Länge der aufgetrennten DNA werden je nach Größe der aufzutrennenden DNA verschiedene Molekulargewichtstandards verwendet.

Agarosegele werden zum einen zur Auftrennung von DNA und zum anderen auch zur Kontrolle der Qualität von RNA verwendet. Für die Analyse von RNA wurden Gelträger und Elektrophorese-Apparaturen zuvor mit 1 % SDS oder 1 M NaOH gereinigt.

#### 3.3.1.3.1 TBE-Agarosegele

Für Agarosegele zur Genotypisierung wurden 2 %ige Gele angefertigt, für die Auftrennung von RNA und für die cDNA zur Herstellung von subtraktiven cDNA-Bibliotheken 1 %ige Gele. Die vervielfältigten Klone aus den subtraktiven cDNA-Bibliotheken wurden auf 0,8 %igen Gelen analysiert. Die entsprechende Menge Agarose wurde in Wasser aufgeköcht. Nachdem sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte, wurde das verdampfte Wasser ersetzt und die entsprechende Menge an 10 x TBE-Puffer für eine 1-fach konzentrierte Gellösung zugesetzt. Fertige Gellösung und gegebenenfalls Laufpuffer wurden mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) versetzt. Die Auftrennung der Nukleinsäurefragmente erfolgte bei 3 V/cm für 6 min bis 18 min und 5 V/cm für 30 min bis zu 1,5 h.

Alle Gele wurden unter Verwendung des Stratagene Eagleeye II dokumentiert.

Die Visualisierung von cDNA erfolgte bei einer Wellenlänge von 256 nm, für alle anderen Zwecke wurde die Wellenlänge von 366 nm verwendet.

Zusammensetzung des 10 x TBE-Puffer:

108 g	Tris Base
55 g	Borsäure
40 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
	ad 1 Liter Wasser

### 3.3.2 Nebennierenpräparation

#### 3.3.2.1 Gewinnung von nativem Material

Für unsere Untersuchungen haben wir uns auf die Nebenniere als Untersuchungsorgan konzentriert. Die Entnahme der Nebennieren erfolgte immer um 12 Uhr. Für die

Probengewinnung zur Herstellung von subtraktiven cDNA-Bibliotheken und die Hybridisierung der Microarrays wurden die Tiere in Äther anästhesiert und die Bauchhöhle eröffnet. Die Tiere wurden durch die Eröffnung der Aorta entblutet, wobei das Blut in einem Eppendorfgefäß aufgefangen wurde. Danach wurden die Nebennieren entnommen und ohne Zeitverzug in ein Eppendorfgefäß, das 1 ml RNAlater<sup>TM</sup> enthielt, überführt. RNAlater<sup>TM</sup> dient als Schutzreagenz für die RNA und verhindert deren Degradation. In diesem Reagenz wurden die Nebennieren über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde unter der Stereolupe das umgebende Fettgewebe entfernt und die Nebennieren bis zur weiteren Verwendung in frischem RNAlater<sup>TM</sup> bei – 80 °C aufbewahrt.

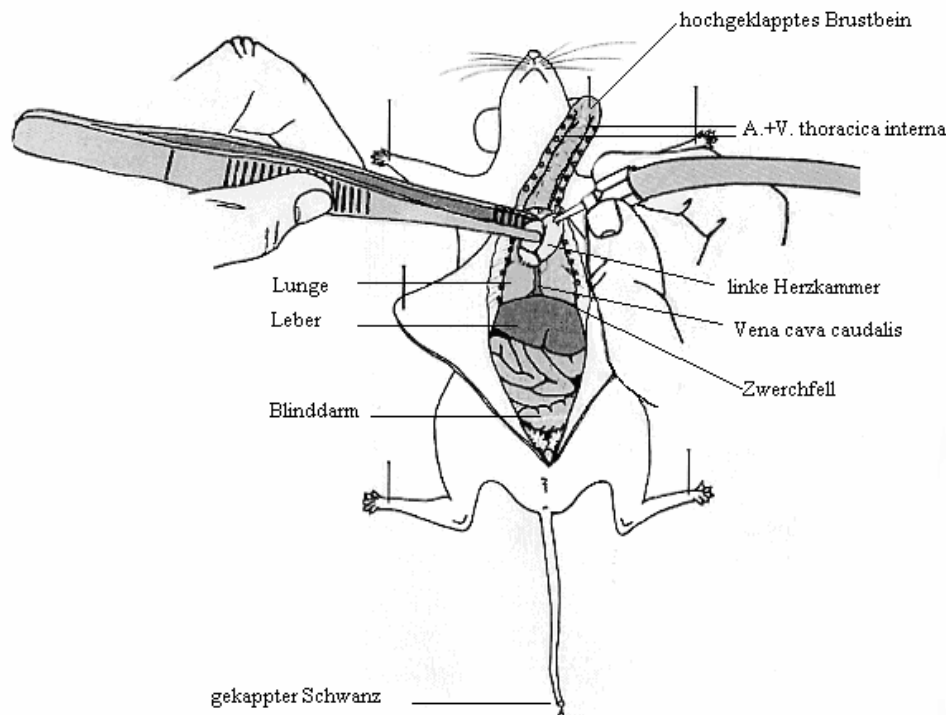
Für die Untersuchung der Proteine wurden die Nebennieren auf dieselbe Weise entnommen. Nach der Entnahme wurden sie allerdings auf eine gekühlte Metallplatte gegeben und sofort unter der Stereolupe vom umgebenden Fettgewebe befreit. Danach wurden sie gewogen und innerhalb von 8 min in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Außer den Nebennieren wurden zusätzlich Anteile der Leber und beide Nieren als Organe gewonnen und konserviert. Das erhaltene Blut wurde zentrifugiert und das gewonnene Serum ebenfalls bei – 80 °C aufbewahrt.

#### 3.3.2.2 Gewinnung von perfundierten Nebennieren für die Morphometrie

Die Fixierung der Nebennieren für die quantitativ-stereologischen Untersuchungen erfolgte durch vaskuläre Perfusion. Die Perfusionsfixierung erfolgte unter Verwendung einer Apparatur, die eine Perfusion durch die Schwerkraft ermöglicht (=Fallstromperfusion). Die körperwarmen Lösungen wurden durch Infusionsschläuche über eine Heidelbergerverlängerung zum Tier geleitet. Die Umstellung von PBS (pH 7,4) auf 3 %ige Glutaraldehydlösung erfolgte über einen integrierten 3-Wege Hahn.

Unmittelbar nach der Euthansie der Mäuse durch Ätherinhalation wurde das Gefäßsystem über den linken Herzventrikel (siehe Abbildung 6) mit körperwarmem PBS gespült. Gleichzeitig mit dem Beginn der Infusion wurde die hintere Hohlvene zwischen Leber und Zwerchfell zur Drainage eröffnet. Nach 20 sekundiger Spülung unter einem hydrostatischen Druck von 100 mm Hg wurde, ohne Unterbrechung des Perfusionsflusses und unter Beibehaltung des Drucks, zur Fixierung 5 min mit Glutaraldehydlösung perfundiert. Nach Beendigung der Perfusion wurde der perfusionsfixierte Tierkörper über Nacht in einem Gefäß im selben Fixationsmittel bis zur weiteren Präparation der Nebennieren aufbewahrt.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Perfusionsfixation. Dargestellt ist das Einführen der Kanüle in die linke Herzkammer (Andreas Blutke, 2004).**

### 3.3.3 Untersuchung des Transkriptoms

#### 3.3.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Isolierung der RNA wurden die Nebennieren zunächst in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit Trizol<sup>TM</sup> Reagenz überführt. Laut Protokoll des Herstellers ist 1 ml Trizol<sup>TM</sup> Reagenz für 50-100 mg Gewebe ausreichend. Da eine Nebenniere nur ca. 3 mg wiegt, wurde für beide Nebennieren die Mindestmenge von 0,5 ml des Reagenz verwendet.

Das Nebennierengewebe wurde mit einem Homogenisator in zwei Intervallen von jeweils 30 sec zerkleinert und lysiert. Dann wurde das Homogenat 5 min bei RT stehen gelassen, damit sich RNA-Protein-Komplexe vollständig auflösen konnten. Nach Zugabe von 0,1 ml Chloroform wurde die Probe per Hand 15 sec heftig geschüttelt und weitere 3 min bei RT stehen gelassen. Danach wurde bei 12000 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Dabei trennt sich die Probe in eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, welche die DNA enthält, eine Interphase, in welcher die Proteine bleiben, und eine obere farblose wässrige Phase. Diese

enthält die RNA und macht ca. 60% der ursprünglichen Trizol-Menge aus. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit 250 µl Isopropanol versetzt, um die RNA zu fällen. Die gefällte RNA wurde durch Zentrifugation für 10 min bei 12000 x g und 4 °C sedimentiert. Anschließend wurde die RNA mit 0,5 ml 75 %igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl filtriertem Reinstwasser bei RT gelöst. Von dieser Lösung wurde 1 µl RNA in Reinstwasser 1:100 verdünnt und photometrisch quantifiziert. Die Qualität der präparierten RNA wurde durch Elektrophorese in einem 1 %igen TBE-Agarosegel überprüft. Es wurden 0,5 µl der RNA aufgetragen. Die ribosomale RNA, welche den größten Teil der RNA ausmacht, trennt sich in Form von zwei klaren Banden auf. Die untere Bande entspricht der 18S- und die obere Bande der 28S-rRNA (ribosomale RNA). Nur RNA, welche keine Degradierung aufzeigte, wurde weiter verwendet.

#### 3.3.3.2 Herstellung subtraktiver cDNA-Bibliotheken

Die subtraktiven Banken wurden nach dem SSH-Verfahren (Diatchenko et al. 1996) durch Herrn Dr. rer. nat Stefan Bauersachs hergestellt (Bauersachs et al. 2003). Für die Herstellung der Banken wurden von 11 G Tieren und 11 GB Tieren aus der Altersgruppe 11 Wochen jeweils 5 µg Gesamt-RNA zusammengeführt. Aus diesem Gesamtansatz wurden nach dem SSH-Verfahren zwei cDNA Banken hergestellt. Die eine dient der Anreicherung der Gene in der G Population (Bank GH1), die andere der Anreicherung der Gene der GB Population (Bank GB1). Die daraus resultierenden Klone wurden als Dauerkultur bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung konserviert.

#### 3.3.3.3 Picken und Kultivierung der cDNA-Klone

Von den bei – 80 °C als Dauerkultur konservierten Bakterien wurde mit einem sterilen Skalpell ein Teil abgeschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. 5 µl dieser Suspension wurden in ein zweites Gefäß überführt und auf ein Gesamtvolumen von 100 µl mit LB Medium aufgefüllt. Diese Mischung wurde auf eine LB-Agarplatte (12 x 12 cm) mit Ampicillin (100 µg/ml) pipettiert und mit einem Spatel verteilt. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die über Nacht gewachsenen Bakterienkolonien wurden mit Plastikborsten (herkömmlicher Haushaltsbesen) von den Platten gepickt. Dafür wurden die Borsten abgeschnitten, in 100 %igem Ethanol gewaschen und an der Flamme getrocknet. Die gepickten Bakterien wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten überführt, die 100 µl LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) pro Well enthielten, und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (400 U/min) kultiviert. Die Aufarbeitung der Bakteriensuspension muss nach

spätestens 16 Stunden bei 37 °C erfolgen. Um das Wachstum zu stoppen, wurden die Kulturschalen in den Kühlschrank gestellt. In 96-Well-PCR-Platten wurden in jede Vertiefung 40 µl TE gegeben und aus der Bakteriensuspension mit Hilfe einer 12-Kanal-Pipette jeweils 2 µl in das vorgelegte TE überführt. Die einzelnen Platten wurden mit einer gereinigten und UV-bestrahlten Silikonmatte abgedeckt und für 15 min bei 96 °C denaturiert. Dieser Schritt dient der Lyse der Bakterien und damit der Freisetzung der Plasmide. Auf diese Weise behandelt, kann die Suspension direkt in einer PCR-Reaktion eingesetzt werden. Danach wurden die Platten mit Alufolie zugeklebt und auf Trockeneis eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei –20 °C.

#### 3.3.3.4 Kolonie-PCR zur Amplifizierung der cDNA Klone

**Tabelle 5: Zusammensetzung einer Reaktion der Kolonie-PCR**

Komponenten	Menge [µl]
NLT7 15 pmol/µl	0,4
LT3 15 pmol/µl	0,4
dNTP's, 10 mM	0,4
10 x Reaktionspuffer	2
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,2
Wasser	14,6
TE-Plasmidsuspension	2
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20</b>



**Tabelle 6: Reaktionsbedingungen für die Kolonie-PCR**

Schritt	Temperatur in °C	Zeit in Minuten
1	96	2
2	94	25s
3	64	25s
4	72	1,5
Wiederholungen		34x ab Schritt 3
5	72	5

Von jeder PCR wurden 0,5 µl in einem TBE-Agarosegel (0,8 %) analysiert. Pro Gel wurden 96 Proben mit einer 12-Kanal-Pipette sowie ein DNA-Längenstandard (100 bp Ladder Plus; 100 ng) aufgetragen.

Für jede Bank (G bzw. GB) wurden je 1536 cDNA-Fragmente amplifiziert und analysiert.

### 3.3.3.5 Herstellung von cDNA-Arrays

Zunächst wurden Arrays mit 768 verschiedenen PCR-Produkten zum Vorscreening der Banken hergestellt. Anschließend wurden alle 3072 gewonnenen PCR-Produkte auf zwei Arrays mit jeweils 1536 Proben aufgetragen.

Für die Herstellung der Arrays wurden zunächst in 384-Well-Platten 16 µl 2 x Probenpuffer für Microarrays vorgelegt. Dazu wurden mit der 12-Kanal-Pipette jeweils 16 µl PCR-Produkt gegeben. Nach dem allgemeinen Übertragungsstandard von 96-Well-Platten auf 384-Well-Platten wurde die Position A1 der 96-Well-Platte 1 in die Position A1, die Position A1 der 96-Well-Platte 2 in die Position A2, die Position A1 der 96-Well-Platte 3 in die Position B1 und die Position A1 der 96-Well-Platte 4 in die Position B2 der 384-Well-Platte usw. überführt.

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe eines Microarray Roboters auf Nylon-Membranen (Schleicher & Schuell) gespottet. Um die Membranen dafür vorzubereiten, wurden sie 5 min in Reinstwasser und 5 min in Ethanol p.a. (pro analysi) gewaschen. Nachdem die Membranen getrocknet waren, wurden sie mit einem Schneidegerät mit Hilfe einer Schablone auf die Größe 7,4 x 2,4 cm zugeschnitten. Diese Membranen wurden auf einer Seite am Rand mit Heißleim (Pistole) auf einem Objektträger mit der gleichmäßigen Membran-Oberfläche nach

oben befestigt. Zusätzlich wurden die Membranen im Spotter, nachdem sie sich an die Luftfeuchtigkeit (45%) in dem Gerät angepasst hatten, mit einem Klebestift vorsichtig fixiert. Es wurde jede Probe sechs Mal auf dieselbe Position gedruckt, um eine gleichmäßige DNA-Auftragung zu gewährleisten. Das Steuerprogramm des Roboters definiert die Positionen der Proben auf dem Array und gibt diese dann in Form einer Excel-Liste für das Array-Auswertungsprogramm aus, um die ID-Nummern der cDNA-Klone den Signalen zuordnen zu können.

Nach dem Drucken der Arrays wurden die Membranen von den Objektträgern abgenommen und für 20 min auf 2 dicke Filterpapiere (20 x 30 cm, GB004) und ein dünnes Filterpapier (20 x 30 cm, GB002), die mit frisch hergestellter 0,5 N NaOH getränkt waren, gelegt. Bei diesem Schritt werden die doppelsträngigen PCR-Produkte denaturiert. Anschließend wurden die Arrays zur Fixierung der DNA auf ein neues dünnes Filterpapier gelegt, 30 min bei 80 °C inkubiert und anschließend mit UV-Licht (254nm) mit 120 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt.

Um die Arrays für die Hybridisierung mit den markierten cDNA Proben vorzubereiten, wurden sie in Glashybridisierungsröhren überführt und vor Zugabe der Hybridisierungslösung in einem Hybridisierungssofen wie folgt behandelt:

2 x 10 min 10 ml 1 x PBS / 10 % SDS bei 65 °C

1 x 10 min 10 ml 1 x PBS / 10 % SDS dabei von 65 auf 85 °C

2 x 10 min 10 ml 0,1 x PBS / 1 % SDS bei 85 °C

1 x 10 min 10 ml 1 x PBS / 10 % SDS bei 65 °C

Bis zur Verwendung in 10 ml 1 x PBS / 10 % SDS bei 65 °C

#### 3.3.3.6 cDNA Synthese zur Herstellung von Hybridisierungssonden

Für die Herstellung von Hybridisierungssonden wurde doppelsträngige cDNA verwendet. Dazu wurde die RNA revers transkribiert und mit Hilfe einer DNA-Polymerase der zweite Strang synthetisiert. Durch den Einsatz eines poly-A-spezifischen Primers wurde sichergestellt, dass vor allem die mRNA in cDNA umgeschrieben wurde.

Für die cDNA-Erststrangsynthese wurde im ersten Versuch die Gesamt-RNA aus den beiden Nebennieren eines Tieres verwendet. Im zweiten Ansatz wurden nach Messung der Konzentration 15 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die angegebene Menge an gesamter RNA wurde in 13,5 µl Wasser aufgenommen, 0,5 µl Sonden-Primer (100 pmol/µl) zugegeben und für 10 min bei 80 °C denaturiert. Nach dem Abschrecken auf einem Eis/EtOH-Bad wurden 11 µl Mastermix auf Eis zugeben.

Mastermix für Erststrangsynthese

0,5 µl	RNase-Inhibitor (40 U/µl)
2,5 µl	100 mM DTT
1,0 µl	dNTP-Mix (jeweils 10 mM dATP, dGTP, dTTP und dCTP)
5,0 µl	Erststrang-Puffer (5x)
2,0 µl	Superscript II (200 U/µl)

Die Proben wurden für 10 min bei 37 °C und für weitere 80 min bei 45 °C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Der Erststrangsynthese schließt sich die Zweitstrangsynthese nahtlos an. Für die Synthese des zweiten cDNA-Stranges wurde DNA-Polymerase I aus *E. coli* und RNase H eingesetzt. RNase H degradiert RNA, wenn sie als RNA-DNA Hybrid vorliegt. Das Verhältnis von RNase H und DNA-Polymerase I ist so eingestellt, dass die RNA nur teilweise abgebaut wird und die verbleibenden RNA-Stücke von der DNA-Polymerase I als Primer benutzt werden können. Die *E. coli* DNA-Ligase wird verwendet, um die Fragmente der Zweitstrangsynthese zu verknüpfen. Dadurch erhöht sich die Klonierungseffizienz. Zur Synthese des zweiten cDNA-Stranges wurden 125 µl eines Mastermix zugegeben.

Mastermix für Zweitstrangsynthese

86 µl	Wasser
30 µl	Zweitstrangpuffer (5 x)
3 µl	dNTP-Mix (10 mM)
1 µl	<i>E. coli</i> DNA-Ligase (10 U/µl)
4 µl	<i>E. coli</i> -Polymerase (10 U/µl)
1 µl	<i>E. coli</i> RNase H (2 U/µl)

Alle Reaktionen wurden für 2,5 h bei 16 °C im Kühlwasserbad inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Die Enzyme wurden für 15 min bei 70 °C hitzeinaktiviert und sofort wieder auf Eis gestellt. Anschließend wurde mit RNase die RNA verdaut. Dafür wurden 3 µl

RNAse (0,5mg/ml, DNase frei) zugegeben und für 90 min bei 37°C verdaut. Bis zur weiteren Verwendung wurde die gewonnene cDNA bei -20°C eingefroren.

#### 3.3.3.7 Herstellung von Hybridisierungsproben aus ds cDNA

Für die Herstellung der Hybridisierungsproben wurden 3 µl cDNA eingesetzt. Die cDNA wurde in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt, 3 µl Wasser zugegeben und 10 min bei 96 °C in einem Hybridisierungssofen denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe des Mastermix wurden die Reaktionen bei 37 °C im Metallblock in einem Hybridisierungssofen 4 h inkubiert.

#### Mastermix für Hybridisierungssonden (3 µl cDNA): Angabe für eine Reaktion:

0,375 µl	dNTP-Mix (je 2 mM dATP, dGTP, dTTP, 0.2 mM dCTP)
10,0 µl	$\alpha$ -[ <sup>33</sup> P]-dCTP (2500 Ci/mmol)
4,0 µl	5x High-Prime-Mix (5x)

Der dNTP Mix wurde in späteren Versuchen dahingehend abgeändert, dass nur noch 0,1 mM unmarkiertes dCTP eingesetzt wurde, um eine bessere Markierung der Proben zu erreichen.

Nach der Inkubation wurde die Klenow-Polymerase, die im High-Prime-Mix enthalten ist, für 20 min bei 65 °C inaktiviert und die Ansätze mit 5 µl humaner Cot-1 DNA und 25 µl TE-Puffer versetzt.

Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide erfolgte über Microspin-G25-Säulen. Zunächst wurde die Equilibrierungsflüssigkeit des Säulenmaterials durch Zentrifugation für 1 min bei RT und 720 x g entfernt und anschließend die Probe auf das Säulenmaterial gegeben und für 2 min bei 720 x g zentrifugiert. Das Proben-Eluat wurde in einem Reaktionsgefäß aufgefangen und mit 50 µl bereits vorgelegtem TE-Puffer gemischt. Anschließend erfolgte eine Messung der Aktivität der Sonden.

#### 3.3.3.8 Hybridisierung

Die radioaktiv markierten Sonden wurden vor der Hybridisierung für 10 min bei 96 °C denaturiert und dann auf Eis gestellt. Die Arrays wurden in Plastikvials überführt. In diese Plastikvials wurden die radioaktiv markierten Hybridisierungssonden und 2 ml 1x PBS/10 % SDS (Hybridisierungslösung) zugegeben. Dabei wurden die Sonden zusammen mit der Hybridisierungslösung filtriert (Millex GP 0,22 µm).

Die Hybridisierung erfolgte für 40 h bei 65 °C in einem Hybridisierungssofen. Anschließend wurden die Hybridisierungslösungen abgegossen und die Hybridisierungsgefäße mit 1 x PBS / 10 % SDS aufgefüllt. Die Array-Membranen wurden wieder in Glas-Hybridisierungsröhren überführt und wie folgt in einem Hybridisierungssofen gewaschen:

3 x 5 min 10 ml 1 x PBS / 10 % SDS bei 65 °C

3 x 10 min 10 ml 1 x PBS / 10 % SDS, dabei von 65 °C auf 85 °C

3 x 10 min 10 ml 0,1 x PBS / 1 % SDS bei 85 °C

2 x 10 min 10 ml 1 x PBS / 1 % SDS / 2 mM EDTA bei RT

Die Array-Membranen wurden dann bei 80 °C für 20 min getrocknet. Ein „Storage Phosphor Screen“ wurde entsprechende Zeiten exponiert. Die gespeicherten Signale wurden mit Hilfe eines Phosphor-Imagers (Storm 860) nach etwa 12, 24 und 48 h Exponierung eingelesen.

#### 3.3.3.9 Auswertung der Signale

Die Auswertung der Arrays erfolgte mit der Software AIDA Image Analyzer, teilweise mit der Version 3.11 und teilweise mit der Version 3.52 (raytest). Der Signal-Hintergrund wurde mit der Funktion „*weighted background dot*“ abgezogen.

#### 3.3.3.10 Sequenzierung von cDNA Klonen

cDNAs mit differentiellen Hybridisierungssignalen (Kandidatengene) wurden sequenziert. Dazu wurden 2,5 µl der cDNA-Proben aus den 384-Well-Platten zum Spotten der Arrays entnommen und einer Mikrodialyse unterzogen. Die Sequenzierung wurde unter Verwendung eines 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Langen) vom Sequenzierservice der Arbeitsgruppe Blum (Genzentrum) durchgeführt. Anschließend wurden die erhaltenen Sequenzen mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (National Center for Biotechnology Information) mit den Sequenzen öffentlicher Datenbanken (GenBank) abgeglichen. Informationen über die identifizierten Gene und cDNAs wurden aus öffentlichen Datenbanken wie z.B. UniGene, OMIM, LocusLink oder PubMed entnommen.

#### 3.3.3.11 Datenauswertung und Darstellung der Genexpression

Hybridisierungen mit 1536 PCR-Produkten wurden mindestens zweimal für jedes Tier durchgeführt und unter Verwendung der AIDA Array Software ausgewertet. Die einzelnen Werte wurden für jedes Array bezogen auf den Median normalisiert und aus den beiden

Werten für ein Tier der Mittelwert ( $\text{mean} \pm \text{SD}$ ) gebildet. Um als unterschiedlich reguliert eingeordnet zu werden, musste der Unterschied mindestens den Faktor 2 betragen. Für die graphische Darstellung wurde aus allen Mittelwerten eines Genotyps erneut der Mittelwert gebildet und der Standardfehler errechnet ( $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ).

### **3.3.4 Validierung der Ergebnisse mittels quantitativer PCR**

#### **3.3.4.1 DNase-Verdau**

Die qPCR ermöglicht durch direkte Messung der Vermehrung der DNA während der PCR einen Vergleich zwischen der enthaltenen cDNA Menge in zwei verschiedenen Proben. Diese Messung wird durch Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes erreicht, der bei jeder Vervielfältigung in den Doppelstrang eingelagert wird und dessen Absorption am Ende jedes Zyklus gemessen wird. Um eine Kontamination der Probe (cDNA) mit genomischer DNA zu vermeiden, wird ein DNase Verdau für 15 min bei RT durchgeführt.

#### Mastermix: (Angaben für eine Reaktion)

1 $\mu\text{l}$	DNase I (10 U/ $\mu\text{l}$ )
3 $\mu\text{l}$	DNase I Digest Puffer (10x)
25 $\mu\text{l}$	RNA-Lösung

Nach Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  EDTA 25 mM wurde die DNase für 10 min bei 65 °C inaktiviert.

#### **3.3.4.2 cDNA Synthese für quantitative PCR**

Im ersten Schritt wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Es wurden 400 ng Gesamt-RNA in 20  $\mu\text{l}$  verwendet (20 ng/ $\mu\text{l}$ ). Dafür wurde aus der Dnase-verdauten RNA die entsprechende Menge eingesetzt und auf 10  $\mu\text{l}$  mit Wasser aufgefüllt. Zu der RNA wurden nacheinander Mastermix I bis III zugegeben. Nach Zugabe von Mastermix I wurde die gesamte Reaktion für 5 min bei 65 °C denaturiert. Nach Zugabe von Mastermix II wurde nach einer 10-minütigen Inkubation bei RT die gesamte Reaktion mit einem Thermomixer auf 42 °C erwärmt. Nach 2 min wurde bei dieser Temperatur auf dem Thermomixer Mastermix III zugegeben. Nach Zugabe von Mastermix III verblieb die Reaktion für 50 min bei 42 °C, dann wurde bei 70 °C in 15 min die Enzymaktivität gestoppt. Anschließend wurde die Lösung sofort auf Eis abgekühlt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Mastermix I: (Angaben für eine Reaktion)

1 µl	Random Hexamer Primer (3 µg/µl)
1,0 µl	dNTP-Mix (10 mM je)

Mastermix II: (Angaben für eine Reaktion)

1 µl	RNase-Inhibitor (40 U/µl)
2 µl	100 mM DTT
2 µl	Erststrang-Puffer (5x)

Mastermix III: (Angaben für eine Reaktion)

2 µl	Erststrang-Puffer (5x)
1 µl	Superscript II (200 U/µl)

## 3.3.4.3 Austesten der Primer

Für die zu testenden Gene wurden mit der Computersoftware Primer Express Oligonukleotide abgeleitet, die bei einer Temperatur von 60 °C anlagern. Die Bindungsstellen wurden so gewählt, dass sie entweder durch ein Intron, also den nicht abgelesenen Anteil eines Gens, geteilt wurden und somit keine Bindung innerhalb genomischer DNA möglich war oder so, dass die beiden Oligonukleotide ein Intron umschlossen. Auf diese Weise kann anhand der Bandengröße im Gel zwischen genomischer DNA und cDNA unterschieden werden, oder es kommt nicht zu einer exponentiellen Vervielfältigung, da die Größe des umfaßten Introns zu groß für die PCR Amplifikation ist.

Um diese Primer zu überprüfen wurde zunächst eine Test PCR mit genomischer DNA und cDNA durchgeführt.

**Tabelle 7: Zusammensetzung einer Reaktion**

Komponenten	Menge [ $\mu$ l]
10x Puffer	2
MgCl (25 mM)	1,25
1 mM dNTPs	2
Primer sense 2 $\mu$ M	1
Primer antisense 2 $\mu$ M	1
Wasser	11,5
HotstarTaq Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,25
cDNA / DNA	1
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20</b>

**Tabelle 8: Reaktionsbedingungen für die Test PCR**

Schritt	Temperatur in °C	Zeit in Minuten
1	95	3
2	95	0,5
3	60	1
4	72	1
Wiederholungen		35x ab Schritt 3
5	72	10

#### 3.3.4.4 Erstellen einer Standardkurve

Um eine Standardkurve für die Quantifizierung durch die qPCR zu erstellen, wurde das in der Test-PCR gewonnene PCR-Produkt mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits (Invitrogen) in einen Vektor kloniert (pCR®2.1-TOPO). Dieses Plasmid wurde durch Hitzeschock in chemisch kompetente Bakterien eingeschleust. Die Bakteriensuspension wurde erst über Nacht auf LB-Agarplatten mit 50  $\mu$ g/ml Ampicillin bei 37 °C kultiviert. Zusätzlich zur



Bakteriensuspension wurden auf die LB-Agarplatte 40 µl XGal (40 mg/ml) aufgetragen, um zu unterscheiden, welche Bakterien den Vektor aufgenommen hatten und welche nicht. Bei XGal handelt es sich um farbloses 5-Chlor-4-brom-3-indolyl-β-D-galactopyranosid. Nach Spaltung durch β-Galactosidase erfolgt ein Farbumschlag nach Blau. Der Einbau des PCR-Produktes in das Plasmid erfolgt innerhalb der Gen-Sequenz eines Teils der β-Galactosidase, somit kann XGal von diesen Bakterien nicht mehr gespalten werden. Deshalb erscheinen Bakterienkolonien, die eine richtige Insertion im Plasmid enthalten, weiß.

Drei der weißen Klone wurden gepickt und über Nacht in 4 ml flüssigem LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin bei 37 °C kultiviert. Aus dieser Kultur wurden am nächsten Tag die Plasmide mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert.

Die Konzentration der so gewonnenen Plasmid-DNA wurde durch UV-Messung bestimmt. Danach wurde ein Teil der Plasmide mit dem Restriktionsenzym *EcoR I* gespalten, welches Schnittstellen auf beiden Seiten der Klonierungsstelle des Vektors hat. Damit wurde überprüft, ob das PCR-Produkt tatsächlich kloniert wurde. Ein zweiter Verdau wurde mit *XhoI* durchgeführt, welches nur eine Schnittstelle im Plasmid hat und so zu einer Linearisierung des Plasmids führt. Dieses linearisierte Plasmid wurde für die Erstellung der Standardkurve verwendet. Zunächst wurde das Molekulargewicht errechnet und anhand der gemessenen Menge die Anzahl der enthaltenen Plasmide bestimmt. Diese Konzentration wurde auf 1 Million Plasmide pro µl verdünnt und davon ausgehend eine Verdünnungsreihe in 7 Schritten bis zu 640 Plasmiden/µl erstellt.

**Tabelle 9: Zusammensetzung einer Reaktion für die Standardkurve der qPCR**

Der SYBR Green PCR Mix enthält AmpliTaq DNA Polymerase, SYBR Green PCR Puffer, dNTP Mix und SYBR Green als Fluoreszenzfarbstoff.

Komponenten	Menge [µl]
AmpErase®	0,125
Primer sense 5 µM	1,5
Primer antisense 5 µM	1,5
Wasser	7,25
SYBR-Green PCR-Mix	12,5
cDNA	2
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25</b>

**Tabelle 10: Reaktionsbedingungen in einem Applied Biosystems 7000 Sequence Detection System**

Schritt	Temperatur in °C	Zeit in Minuten
1	50	2
2	95	10
3	95	0,25
4	60	0,5
5	72	0,5
Wiederholungen		39x ab Schritt 3
6	72	10

Die Standardkurve dient in allen weiteren Experimenten der Ermittlung der in der Probe enthaltenen Kopienzahlen des Zielgens.

Es wurde eine Standardkurve für jedes untersuchte Gen und für  $\beta$ -Aktin als Housekeeping-Gen erstellt.

Sowohl das Insert als auch das PCR-Produkt der Probe-PCR wurden nach einer Microdialyse sequenziert, um sicherzustellen, dass es sich dabei um das zu untersuchende Zielgen handelt.

#### 3.3.4.5 Quantitative PCR

Alle Reaktionen wurden in Triplikaten angesetzt. Die Zusammensetzung für eine Reaktion und das Programm wurden analog zur Test-PCR angesetzt. Im Anschluß an die qPCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse der entstandenen PCR-Produkte durchgeführt, bei dieser Analyse werden spezifische und unspezifische (Primer-Dimere) PCR-Produkte nachgewiesen. Dazu wird im Temperaturbereich von 60 °C bis 95 °C in 1 °C-Schritten die Fluoreszenzintensität gemessen. Primer-Dimere besitzen eine niedrigere Schmelztemperatur, als spezifische Produkte, da sie kürzer sind. Nach der Durchführung der qPCR wurden alle Produkte auf einem 2 % TBE-Agarosegel untersucht, um zusätzlich sicherzustellen, dass keine Primer-Dimere oder andere unspezifische Produkte entstanden sind.

#### 3.3.4.6 Datenauswertung und Darstellung der qPCR

Für die Auswertung der qPCR mit den unbekannten Werten wurden diese zunächst mit Hilfe der Standardkurve auf die in der Probe enthaltene Kopienzahl umgerechnet. Diese Kopienzahl wurde mit folgender Formel für die Werte jedes einzelnen Tieres auf das gewählte Housekeeping-Gen  $\beta$ -Aktin normalisiert:

$$\text{Normalisierter Wert} = \frac{\text{Kopienzahl des Kandidatengens}}{\text{Kopienzahl des Housekeepinggens}}$$

Die normalisierten Werte wurden nun noch mit dem normalisierten Mittelwert der Kontrollgruppe für jedes Tier einzeln kalibriert. Dafür wurde der Wert der Kontrollgruppe auf 1 gesetzt und die anderen Genotypen entsprechend bestimmt.

$$\text{Kalibrierter Wert} = \frac{\text{Normalisierter Wert}}{\text{Kalibrator (Kontrollgruppe)}}$$

Für die Darstellung wurde aus den Tieren eines Genotyps jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung verwendet (mean  $\pm$  SD).

### 3.3.5 Untersuchung von bekannten Signalkaskaden

#### 3.3.5.1 Proteinisolierung

Um die Proteine aus den Nebennieren zu isolieren wurden in ein 5 ml Rotilabo Transportröhrchen 1,5 ml Probenextraktionspuffer vorgelegt. Das gefrorene Organ wurde in den Puffer gegeben und bei RT aufgetaut. Anschließend wurde es für 30 s mit einem Gewebehomogenisator homogenisiert. Nach jeder Probe wurde der Homogenisatorstab mit Wasser gespült und mit Extraktionspuffer benetzt. Das Homogenat wurde, um größere Organrückstände zu entfernen, für 2 min mit Höchstgeschwindigkeit in einem 2 ml Eppendorfgefäß zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde für die weiteren Untersuchungen verwendet. Zur Denaturierung wurde der Überstand für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt.

#### 3.3.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Das Prinzip der Proteinbestimmung mit BCA beruht darauf, dass Bicinchoninsäure als wasserlösliches Natriumsalz sehr sensitiv, spezifisch und stabil mit  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen reagiert. Man macht sich hier die Biuret-Reaktion der Proteine zunutze, die  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  reduzieren. Der entstehende  $\text{BCA-Cu}^{1+}$ -Komplex ist stabil und wasserlöslich und zeigt eine starke Absorption bei 562 nm. Proteine in wässrigen Lösungen können also bei 562 nm im Photospektrometer mit dieser Methode quantifiziert werden. Proteinmessungen erfolgten in 96-Well-Platten. Die Proben wurden in Extraktionspuffer in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  verdünnt und in die Wells gegeben. Aus einer Stocklösung von BSA wurde eine Verdünnungsreihe in Extraktionspuffer mit 6 Standards hergestellt. 4  $\mu\text{l}$  je Standard sowie ein Leerwert wurden in die Wells gegeben. Bicinchoninsäure wurde mit 4 %iger  $\text{CuSO}_4$ -Lösung (50:1) gemischt und 200  $\mu\text{l}$  dieser Lösung zu jedem Standard und zu jeder Probe gegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die Absorption bei 562 nm gemessen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte anhand der gemessenen Eichkurve. Es handelt sich hierbei nicht um eine direkte Quantifizierung der vorhandenen Proteinmenge, sondern um einen Vergleich der Redoxpotentiale zwischen den bekannten Proteinmengen der Eichkurve und den Proben.

#### 3.3.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine können mittels Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Trennung der Proteine im Polyacrylamidgel erfolgt in Anwesenheit von einem

anionischen Detergenz, Natrium Dodecylsulfat (SDS). SDS geht eine Wechselwirkung mit hydrophoben Regionen der Proteine ein und bewirkt dadurch eine Denaturierung und eine stark negative Ladung der einzelnen Proteine, welche alle vorhandenen Ladungen überdeckt. In Anwesenheit von SDS ist die Laufgeschwindigkeit der Proteine eine lineare Funktion der Logarithmen ihrer Molekulargewichte. Um ein besseres Trennergebnis zu erzielen, wird dem eigentlichen Trenngel ein grobmaschiges Sammelgel vorgeschaltet. Beim Übergang vom Sammelgel zum Trenngel werden die Proteine zu einer Bande fokussiert, was die Bandenschärfe im Trenngel verbessert. Die Porengröße eines Trenngels nimmt mit steigender Vernetzung der Acrylamidketten ab.

#### 3.3.5.4 Herstellung der analytischen Gele

Die 11 %igen analytischen Trenngele wurden wie folgt hergestellt:

##### Trenngel: Angaben für 4 Gele

7,3 ml	Wasser.
5 ml	1,5 M Tris (pH 8,8)
7,2 ml	Acrylamid/Bis-Solution (29:1)
200 µl	10 % SDS
100 µl	10 % Ammoniumpersulfat (APS)
10 µl	Temed

Dieses 11 %ige SDS-Polyacrylamidgel wurde zwischen die für zwei Minigele vorbereiteten Glasplatten eines Mini Protean II-Systems gegossen und sofort mit Wasser überschichtet. Nach mindestens 60 minütiger Polymerisation wurde das Wasser vollständig entfernt und das Trenngel mit einem 5 %igen Sammelgel überschichtet.

Sammelgel: Angaben für 4 Gele

7,00 ml	Wasser
1,25 ml	1,5 M Tris (pH 6.8)
1,50 ml	Acrylamid/Bis-Solution (29:1)
100 µl	10 % SDS
100 µl	10 % APS
5 µl	Temed

Die Kämme wurden in das flüssige Sammelgel gesteckt. Nach 30 min wurden die polymerisierten Gele entweder gleich verwendet oder in Frischhaltefolie bei 4°C gelagert und am nächsten Tag benutzt.

### 3.3.5.5 Beladen des Gels und Elektrophoresebedingungen

Die fertigen Gele wurden in die vorbereitete Gelkammer eingesetzt. Die Gelkammer wurde mit Laufpuffer so weit gefüllt, dass Anode und Kathode bedeckt waren.

#### Zusammensetzung des 10 x Laufpuffer

30,3 g	Tris
144,0 g	Glycin
10,0 g	SDS
	ad 1000 ml Wasser

Daraufhin wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert. Anschließend wurde für 10 min eine Spannung von 100 V und dann für ca. 60 min eine Spannung von 160 V angelegt. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn das Bromphenolblau die untere Kante des Gels erreicht hatte.

### 3.3.5.6 Westernblot

Der Westernblot bezeichnet den Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf eine inerte Membran. Im Anschluss können die übertragenen Proteine durch Antikörper oder Liganden nachgewiesen werden. Die im Alkalischen negativ geladenen Proteine wandern im

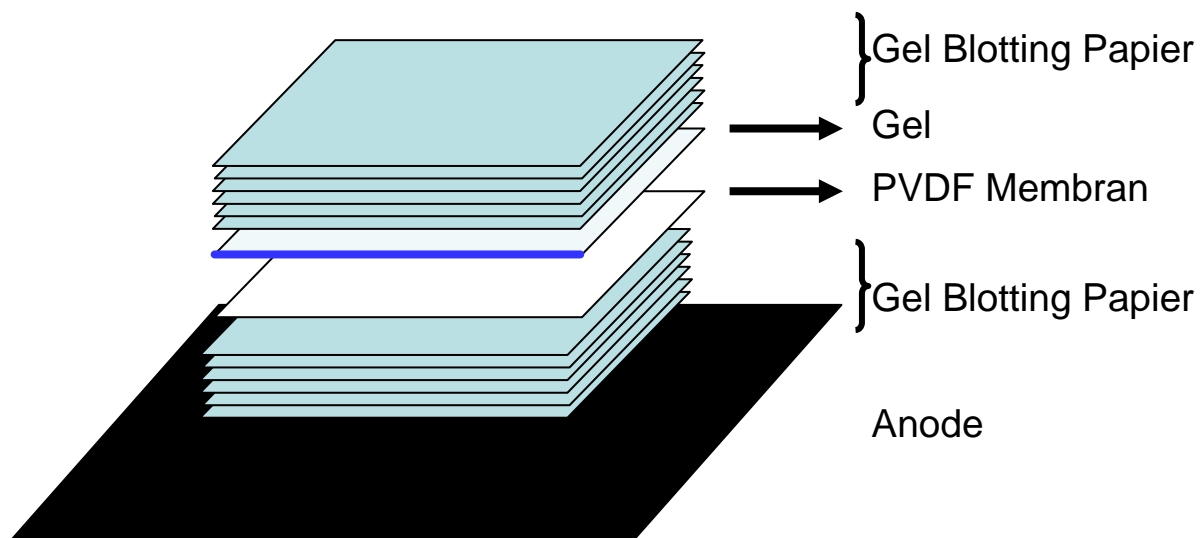
elektrischen Feld, in Richtung der positiv geladenen Anode, und werden auf der PVDF-Membran immobilisiert.

Die ImmobilonP-PVDF-Membranen müssen vor Gebrauch in Methanol benetzbar gemacht werden (10 min). Danach lagern sie bis zur Verwendung in Transferpuffer (ca. 30 min).

Zusammensetzung 10 x Transferpuffer:

58 g	Tris
29 g	Glycin
3,7 g	SDS
Ad 1000 ml Wasser	

Der Aufbau des Blots fand unter Ausschluss von Luftblasen auf der unteren Graphit-Bloteinheit (Anode) statt.



**Abbildung 7: Aufbau eines Westernblots**

**3 x 2 in Transferpuffer getränkte Gel-Blotting-Papiere (GB002)**

**Gel**

**PVDF-Membran (nochmals mit Transferpuffer überspült)**

**3 x 2 in Transferpuffer getränkte Gel-Blotting-Papiere (GB002)**

Anschließend wurde die obere Graphit-Bloteinheit (Katode) unter leichtem Druck aufgesetzt. Die Proteine wurden mit  $1 \text{ mA/cm}^2$ , was einer Spannung von  $60 \text{ mA/Membran}$  entspricht, auf die Membran transferiert. Die Transferzeit betrug 90 Minuten.

### 3.3.5.7 Coomassie Färbung

Die auf der PVDF-Membran gebundenen Proteine wurden mit Coomassie gefärbt. Die Färbung des Blots findet für ca. 2 min in der Coomassie-Lösung statt. Dann wurden die Banden des Markers mit einem wasserfesten Stift markiert. Danach wurde der Blot bis zur Entfärbung des Hintergrundes mit Entfärbelösung gewaschen. Um die Entfärbungskinetik zu verbessern, wurde dieser Waschschrift in mehreren aufeinanderfolgenden Bädern durchgeführt.

Coomassiefärbelösung:	0,5 g Coomassie Blue R
	800ml Methanol
	140 ml Essigsäure
	Ad 2 l Wasser

Coomassieentfärbelösung:	400 ml Methanol
	70 ml Essigsäure
	Ad 1 l Wasser

### 3.3.5.8 Immunoblot

Der Immunoblot bezeichnet den Nachweis von spezifischen Proteinen mittels einer Antigen-Antikörper-Kopplung. Auf das Antigen, in diesem Fall das zu untersuchende Protein, wird ein erster Antikörper (AK) gegeben, der das Antigen spezifisch bindet. Der zweite Antikörper ist mit einem Enzym (z.B. Peroxidase) gekoppelt und gegen den konstanten Teil des ersten AK gerichtet.

In TBS, welches 0,1 % Tween 20 enthielt (TBS-T), wurde die Blotmembran unter Zusatz von 5 % Milchpulver (w/v) für 60 min bei Raumtemperatur (RT) zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Anschließend folgten drei Waschvorgänge mit TBS-T bei RT für 5 min. Über Nacht inkubierte der erste Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 im Antikörper Verdünnungspuffer (TBS-T mit 5 % Milchpulver) bei 4 °C. Es folgten drei weitere Waschschrte bei RT mit TBS-T für 5 min und die Zugabe des zweiten, Peroxidase-konjugierten Antikörpers (Anti-HPRT-Kanichen aus Ziege) in einer Verdünnung von 1:2000 in Antikörper Verdünnungspuffer (TBS-T mit 5 % Milchpulver) für 60 min bei RT. Nach erneutem dreimaligem Waschen für 5 min mit TBS-T fand die Detektion der Proteine unter Verwendung einer ECL-(Enhanced Chemiluminescence)-Detektionslösung statt. Dafür wurden die Detektionslösungen 1 und 2 in gleichen Anteilen in einem Falcon gemischt und



die Membran damit für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen und zur Detektion auf die Kodak Image Station aufgelegt. Zunächst wurde unter Tageslicht der Standard detektiert, um die Banden des Markers abzuspeichern. Anschließend wurden die Signale im Dunkeln detektiert. Die Detektionszeit wurde so gewählt, dass ein optimales Verhältnis zwischen Bandenintensität und Hintergrund erreicht wurde.

#### 3.3.5.9 Strippen der Membranen

Das so genannte Strippen der Membranen dient der Entfernung von gebundenen Antikörpern und ermöglicht dadurch eine mehrmalige Verwendung, was bedeutet, dass man mit relativ wenig Protein mehrere Antikörper einsetzen kann.

Die Membran wurde in einer Hybridisierungsröhre mit Elutionspuffer bedeckt, wodurch bei 70 °C für 60 Minuten unter Drehen die gebundenen Antikörper eluiert wurden. Anschließend wurde durch Waschen in einem großvolumigen Gefäß der Elutionspuffer wieder entfernt. Gewaschen wurde zweimal für 10 Minuten in entsalztem Wasser und einmal für 10 Minuten in TBS-T. Die Flüssigkeitsmenge sollte mindestens 1 l sein. Der Elutionspuffer kann aufgefangen und mehrmals wieder verwendet werden. Nach dem Waschen wurden die Membranen in Falcons im Kühlschrank bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

#### 3.3.5.10 Datenauswertung und Darstellung der Proteinanalyse

Für die Darstellung der Ergebnisse aus den Proteinuntersuchungen wurde der Mittelwert mit dem Standardfehler ( $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ) für alle Tiere eines Genotyps berechnet. Zur Prüfung der Signifikanz wurde der t-Test verwendet und ab einem Wert  $p < 0,05$  wurden die Ergebnisse als signifikant betrachtet.

### 3.3.6 Stereologische Untersuchungen der Nebennieren

#### 3.3.6.1 Präparation der Nebennieren für stereologische Untersuchungen

Für die quantitativ-stereologischen Untersuchungen der Nebennieren der 38 Tage alten Mäuse wurden diese aus den perfundierten Tieren entnommen, vom umgebenden Gewebe freipräpariert und bis auf 0,1 mg genau gewogen. Bis zur weiteren Verwendung wurden sie in Glutaraldehyd aufbewahrt.

Die Vorbereitungen für die morphometrischen Untersuchungen wurden am Institut für Tierpathologie durch Mitarbeiter dieses Instituts durchgeführt.

Die linke Nebenniere wurde routinemäßig in einem Autotechnicon Duo2A (Technicon, Dublin Irland) weiterverarbeitet und in Paraffin eingebettet. Mit einem HM 315 Mikrotom (Microm GmbH) wurden Serienschnitte mit einer nominellen Dicke von 3  $\mu\text{m}$  angefertigt. Jeder 20. Schnitt dieser Serie wurde aufgefangen, auf einen Objektträger aufgezogen und mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbt. Es wurden zwischen 19 und 27 Schnitte pro Nebenniere gewonnen.

Die rechte Nebenniere wurde nach 3-maligem Spülen in Waschlösung ( 6,84 g/dl Saccharose in Sörensen Phosphat Puffer, pH 7,4) mit 1 % Osmiumtetroxid bei 4 °C für 4 h nachfixiert, erneut gespült, in einer aufsteigenden Acetonreihe bei 4 °C dehydriert und in Epon eingebettet. Nach dem Zuschneiden der Blöcke wurden Semidünnschnitte mit einer Dicke von 0,5  $\mu\text{m}$  angefertigt. Die ersten 8 vollständigen Schnitte, die Mark und Rinde enthielten, wurden auf Objektträger aufgezogen und durchnummeriert. Anschließend wurden sie mit Toluidinblau/Safranin gefärbt.

### 3.3.6.2 Bestimmung der Anteile der einzelnen Nebennierenfraktionen

Die morphometrischen Untersuchungen wurden an einem Videoplan<sup>®</sup> Image Analysis System (Zeiss-Kontron), welches über ein Lichtmikroskop (Orthoplan, Leitz) mit einer Kamera (CCTV WV-CD132E, Matsushita, Japan) verbunden ist, durchgeführt. Dieses System ermöglicht die Bestimmung der Querschnittsfläche eines Objekts mit Hilfe eines Digitalisierbrettes und eines Cursors. Dadurch wurde die Querschnittsfläche vom Mark in jedem Schnitt ermittelt und sowie die Gesamtfläche von jedem Schnitt. Durch Addition wurde die gesamte Markfläche ( $A_{(\text{Mark/Nebenniere})}$ ) in  $\text{mm}^2$ , als auch die Gesamtfläche ( $A_{(\text{Nebenniere})}$ ) in  $\text{mm}^2$  planimetrisch bestimmt. Vor jedem neuen Satz an Schnitten wurde das System mit dem Objektmikrometer geeicht. Die Fläche der Rinde  $A_{(\text{Rinde,Nebenniere})}$  wurde durch Subtraktion der Summe der gemessenen Fläche  $A_{(\text{Mark,Nebenniere})}$  von der Summe der Gesamtfläche  $A_{(\text{Nebenniere})}$  ermittelt.

Die Berechnung der Volumendichte der Rinde  $V_{(\text{Rinde/Nebenniere})}$  erfolgte nach dem Prinzip von Delesse. Der französische Geologe Delesse stellte fest, dass der an Schliffflächen von Gesteinen ermittelte Flächeninhalt der jeweiligen Mineralien dem jeweiligen Volumeninhalt entsprach. Als weitere Vereinfachung der Volumenbestimmung wurde von den Geologen Thomson (1930) und Glagolev (1933) das Punktzählverfahren eingeführt.

Das Verhältnis der Flächeninhalte  $A_A$  bzw das Punkteverhältnis  $P_P$  sind erwartungstreue Schätzwerte für die Volumenanteile der Phasen eines Materials.

$$A_A = P_P = V_V$$

Wobei:

$A_A$  = Flächendichte

$V_V$  = Volumendichte

$P_P$  = Punktdichte

Die Volumendichte der Nebennierenrinde an der gesamten Nebenniere  $V_{V(\text{Rinde/Nebenniere})}$  wurde durch die Division der Summe der Flächeninhalte der Nebennierenrinde durch die Summe der Flächeninhalte der gesamten Nebenniere ermittelt. Die Berechnung für  $V_{V(\text{Mark/Nebenniere})}$  erfolgte analog.

Das Volumen der Nebenniere wurde als Quotient der Nebenniere und dem spezifischen Gewicht von Nebennieren ( $1,039 \text{ mg/mm}^3$ ) ermittelt (Swinyard CA 1939). Der Absolutschätzwert des Volumens der Rinde ( $V_{(\text{Rinde/Nebenniere})}$ ) und der Absolutschätzwert des Volumens des Marks ( $V_{(\text{Mark/Nebenniere})}$ ) wurden aus dem Produkt der Volumendichte der einzelnen Abschnitte und dem Gesamtvolumen der Nebenniere berechnet.

### 3.3.6.3 Bestimmung des absoluten Volumens der einzelnen Rindenabschnitte

Die Bestimmung der Volumenanteile der verschiedenen Zonen der Nebennierenrinde erfolgte mittels Punktzählverfahren. Dabei wurde zwischen der Zona glomerulosa, der Zona fasciculata und der X Zone unterschieden. Die Zona fasciculata und die Zona reticularis der murinen Nebenniere lassen sich lichtmikroskopisch nicht unterscheiden und wurden daher zusammengefasst und werden zur Vereinfachung im folgenden als Zona fasciculata bezeichnet (Firth 1983).

Die Punktzählung wurde ebenfalls mit dem Videoplan® Image Analysis System durchgeführt. Über die auf den Bildschirm projizierten Schnittpräparate der Nebennieren wurde ein Gitter mit 6 Schnittpunkten mit gleichem Abstand gelegt. Bei der Zählung wurde immer die Zone gewertet, die der Punkt direkt traf und bei Treffern an Übergängen zwischen Zonen diejenige, welche den Hauptanteil im rechten oberen Quadranten darstellte. Die Untersuchung der Nebennieren wurde mit einer 25-fachen Objektivergrößerung bei einer endgültigen Vergrößerung von 840 x durchgeführt.

Die Präparate wurden systematisch streifenförmig durchgemustert und ausgewertet. Daraus wurde die Punktdichte  $P_P$  der einzelnen Abschnitte berechnet. Der Absolutschätzwert des

Volumens der drei Anteile wurde aus dem Produkt von  $P_p$  und dem Referenzvolumen, in diesem Fall  $V_{(\text{Rinde/Nebenniere})}$  berechnet.

#### 3.3.6.4 Bestimmung der Zellzahl und Zellgröße von Zona fasciculata Zellen

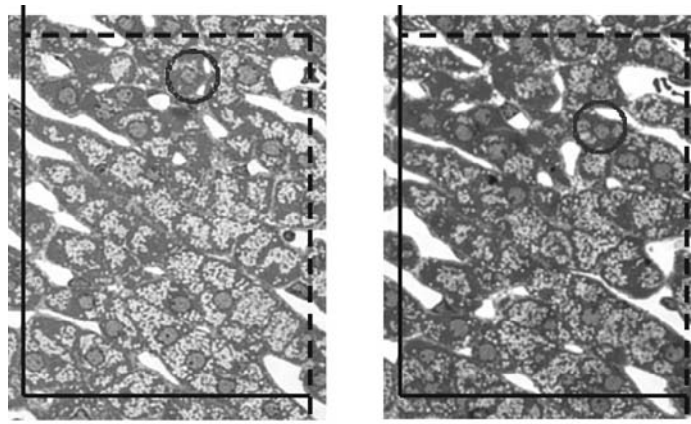
Zellzahl und Zellgröße der Zona fasciculata Zellen wurden durch einen physikalischen Disektor in Kombination mit einer Punktezählung bestimmt (Sterio, 1984). Der physikalische Disektor besteht im Vergleich zum optischen Disektor aus reellen Schnitten mit einem bekannten Abstand. Für diese Methode wurden Semidünnschnitte ( $0,5\ \mu\text{m}$ ) verwendet.

Der Disektor besteht aus einer Referenzebene mit einer bekannten Fläche (reference plane) und einer parallel dazu in einem bekannten Abstand angeordneten Vergleichsebene (look-up plane). Auf diese Weise erhält man ein dreidimensionales Testsystem mit bekanntem Volumen. Gezählt werden nun Partikel, in unserem Fall Zellkerne, die von der Referenzebene erfasst werden und von der Vergleichsebene nicht. Da Zona fasciculata Zellen nur über einen Kern verfügen (Firth 1983), entspricht die Anzahl der gezählten Kerne der Anzahl der gezählten Zellen. Um die Anzahl der getroffenen Zellkerne zu erhöhen, wurde nach dem ersten Durchgang die Referenzebene mit der Vergleichsebene vertauscht und hier ebenfalls die nur in einer Ebene getroffenen Zellkerne ( $Q'$ ) gezählt. Mit dem Disektor werden Teilchen in einem dreidimensionalen Testsystem unabhängig von ihrer Größe oder Gestalt gezählt. Diese Methode ermöglicht eine verzerrungsfreie Schätzung der numerischen Volumendichte (Sterio 1984).

Mit Hilfe einer Zufallszahlentabelle wurde unter Auslassung des ersten Schnittes ein Schnitt gewählt. Von diesem ausgehend wurde bei einer Zahl bis zum 5. Schnitt aufsteigend der drittnächste verwendet. Bei den Schnitten mit den Zahlen über 5, wurde als zweiter Schnitt drei nach unten gezählt. Dadurch wurden Disektoren mit einer Höhe von  $1,5\ \mu\text{m}$  hergestellt.

Aus diesen beiden Schnitten wurden an einem Lichtmikroskop (Axiovert 200M) mit einer angeschlossenen Farbkamera mit einem Ölimmersionsobjektiv mit 63-facher Vergrößerung jeweils 7 deckungsgleiche Aufnahmen aus der Zona fasciculata angefertigt. Der Bereich der Aufnahmen wurde zufällig ausgewählt.

Diese Schnitte wurden im DIN A4 Format ausgedruckt. Da die Kamera fest installiert ist, stimmt der photographierte Ausschnitt auf den beiden Ausdrucken nur bedingt überein. Daher wurde aus Klarsichtfolie eine Schablone im Format  $13 \times 17\ \text{cm}$  hergestellt. Diese Schablone diente auch als erwartungstreues Testfeld nach Gundersen (Gundersen 1977). Für die genaue Umrechnung der ausgezählten Fläche in die Ursprungsgröße wurde mit der Computersoftware Axio Vision Release 4.2 eine Skala eingefügt und ebenfalls ausgedruckt.



**Abbildung 8: Zwei deckungsgleiche Ausschnitte aus einer Nebenniere mit einem Abstand von 1,5  $\mu\text{m}$  in einem erwartungstreuen Testfeld nach Gundersen. In der Referenzebene ist ein Zellkern eingezeichnet, der sich in der Vergleichsebene ( $Q$ ) nicht findet. In einem zweiten Schritt wurden die beiden Ebenen ausgetauscht. Zellkerne, welche die durchbrochene Linie berühren werden bei der Zählung nicht erfasst.**

Der Quotient aus  $Q^-$  und dem Disektorvolumen ergibt einen Schätzwert für die numerische Volumendichte der Partikel ( $N_V$ ). Das Disektorvolumen ergibt sich aus der Testfeldfläche und der Distanz zwischen den beiden ausgewerteten Ebenen. Das gesamte Disektorvolumen ergibt sich aus der Summe aller 7 Disektoren, die dann noch mal mit dem Faktor 2 multipliziert werden, da die Bestimmung von  $Q^-$  in zwei Richtungen erfolgte. Die Zahl der Zona fasciculata Zellen ( $N_{(\text{Zona fasciculata Zellen, Nebenniere})}$ ) ergibt sich aus dem Produkt der numerischen Dichte der Zona fasciculata Zellen ( $N_{V(\text{Zona fasciculata Zellen/Zona fasciculata})}$ ) und dem absoluten Volumen der Zona fasciculata ( $V_{(\text{Zona fasciculata; Nebenniere})}$ ).

Zur Bestimmung der Volumendichte ( $V_{V(\text{Zona fasciculata Zellen/Zona fasciculata})}$ ) der Zona fasciculata Zellen in der Zona fasciculata wurde mit den Photographien zusätzlich eine Punktzählung durchgeführt. Dafür wurde eine Plastikfolie im Format 13 x 17 cm angefertigt, auf der sich gleichmäßig verteilte Punkte ( $n = 70$ ) befanden. Es wurden alle Punkte gezählt, die Zona fasciculata Zellen ( $P_{(\text{Zona fasciculata Zellen})}$ ) trafen und alle, die auf Zona fasciculata trafen ( $P_{(\text{Zona fasciculata})}$ ).

Das mittlere Volumen der Zona fasciculata Zellen ( $V_{(\text{zona fasciculata Zellen})}$ ) wurde bestimmt in dem die Volumendichte ( $V_{V(\text{Zona fasciculata Zellen/Zona fasciculata})}$ ) durch die numerische Dichte ( $N_{V(\text{Zona fasciculata Zellen/Zona fasciculata})}$ ) dividiert wurde.

#### 3.3.6.5 Datenauswertung und Darstellung der Morphometrie

Für die Darstellung der Ergebnisse aus den morphologischen Untersuchungen wurde der Mittelwert mit der Standardabweichung ( $\text{mean} \pm \text{SD}$ ) für alle Tiere eines Genotyps berechnet. Zur Prüfung der Signifikanz wurde mit SAS eine Anova-Analyse und ein LSD-Test (Least significant difference) durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Mäusekollektiv

Alle Untersuchungen dieser Arbeit wurden am selben Mäusekollektiv durchgeführt, um einander ergänzend zur Klärung des Mechanismus der Zellzahl- und Zellgrößenregulation in der Nebenniere beizutragen. Es wurden Mäuse mit einem Alter von 11 Wochen und von 38 Tagen eingesetzt. Alle Mäuse stammten aus der Anpaarung heterozygoter IGFBP-2-transgener Weibchen mit heterozygoten GH-transgenen Männchen. Dadurch wurden Nachkommen mit vier verschiedenen Genotypen erzeugt: GH-transgene Tiere (G), IGFBP-2-transgene (B), doppeltransgene Tiere (GB) und nichttransgene Tiere (C). Es wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet, um ein einheitliches Versuchskollektiv zu erhalten. Als Untersuchungsorgan dienten die Nebennieren der Tiere. Bei der Untersuchung des Transkriptoms und der Signalkaskaden wurden beide Nebennieren gemeinsam verwendet, für die quantitativ-stereologischen Untersuchungen wurden die Nebennieren getrennt in verschiedenen Untersuchungsverfahren eingesetzt.

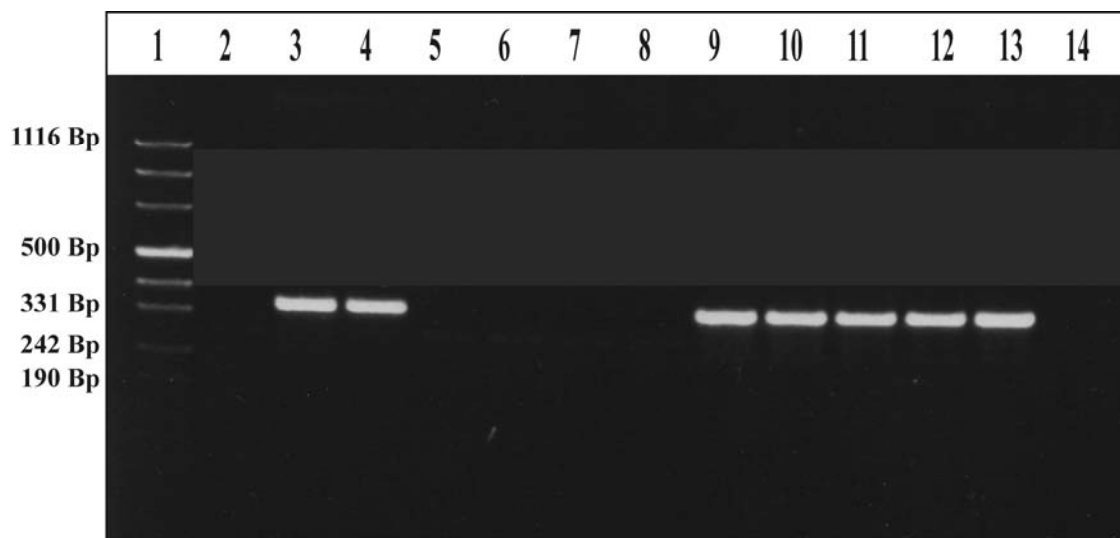
Von den 38 Tage alten Tieren wurden für die Untersuchung des Transkriptoms 6 mit dem Genotyp G und 5 mit dem Genotyp GB eingesetzt. Die qPCR erfolgte mit 3 C- und GB-Tieren und 2 G Tieren. Für die Proteinuntersuchung wurden aus dieser Altersgruppe von jedem Genotyp 3 Tiere eingesetzt. Die stereologischen Messungen wurden ebenfalls an 3 Tieren von jedem Genotyp durchgeführt.

Von den 11 Wochen alten Tieren wurden für die Herstellung der subtraktiven cDNA-Bibliotheken Proben von 11 G Tieren und von 11 GB Tieren verwendet und für die anschließenden Hybridisierungen wurden davon jeweils 6 Tiere eingesetzt. Die qPCR erfolgte mit jeweils 3 Tieren aus den Gruppen G, GB und C und für die Proteinuntersuchungen wurden 6 Tiere von jedem Genotyp verwendet.

### 4.2 Genotypisierung der Tiere

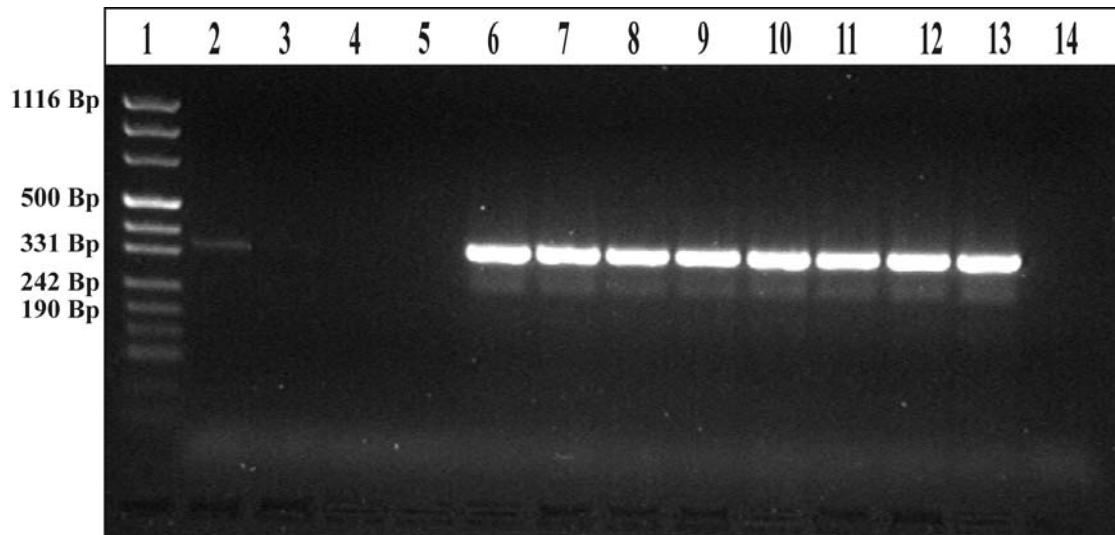
Zur Unterscheidung der vier möglichen Genotypen bei den Nachkommen wurden spezifische PCR-Reaktionen durchgeführt. Als Template für die PCR-Reaktion wurde, nach proteolytischem Verdau, genomische DNA aus den Schwanzspitzen eingesetzt. Die verwendeten Primer binden innerhalb des Transgens. Es wurde Hotstar Taq Polymerase

verwendet, die durch eine 15 minütige Hitzebehandlung (96 °C) zu Beginn der Reaktion aktiviert wird. Auf diese Weise kann die Bildung von Primer-Dimeren vermieden werden. Zur Auftrennung der PCR-Produkte wurden 2 %ige TBE-Agarosegele hergestellt. Das erwartete Fragment aus der PCR für das PEPCK-bGH-Konstrukt hat eine Größe von 343 Bp und das Fragment aus der PCR für das IGFBP-2-Konstrukt 332 Bp. Um die Größe der erhaltenen Fragmente zu bestimmen, wurde ein Molekulargewichtsstandard mit aufgetrennt. Anhand der erhaltenen Produkte konnte der Genotyp bestimmt werden.



**Abbildung 9: PCR für den Nachweis des IGFBP-2-Transgens. In Spur 1 wurde der Molekulargewichtsstandard (pUC Mix Marker 8, 100ng) aufgetragen, in den Spuren 2 bis 12 wurden die PCR-Produkte der untersuchten Tiere aufgetragen. In Spur 13 wurde als Positivkontrolle die PCR für ein bereits positiv getestetes Tier aufgetragen. Spur 14 enthält die Negativkontrolle, bei der Wasser an Stelle des Templates in die PCR-Reaktion eingesetzt wurde.**





**Abbildung 10: PCR für den Nachweis des GH Transgens. In Spur 1 wurde der Molekulargewichtsstandard (pUC Mix Marker 8, 100 ng) aufgetragen, in den Spuren 2 bis 12 die PCR-Produkte der untersuchten Tiere, in Spur 13 wurde als Positivkontrolle die PCR für ein bereits positiv getestetes Tier aufgetragen. Spur 14 enthält die Negativkontrolle, bei der Wasser an Stelle des Templates in die PCR-Reaktion eingesetzt wurde.**

Die Abbildungen 9 und 10 zeigen repräsentative Gelanalysebilder nach einer PCR zur Genotypisierung. Das entsprechende DNA-Fragment erscheint bei Tieren, die für das jeweilige Transgen positiv sind. Die Tiere in Spur 3 und 4 sind positiv für das IGFBP-2-Transgen. Die Tiere in Spur 5 bis 7 sind positiv für das GH-Transgen und die Tiere in Spur 8 bis 11 haben beide Konstrukte und sind damit doppeltransgen. Die leichte Bande in Spur 2 ist möglicherweise durch eine Kontamination der PCR-Reaktion bedingt. Unklare Ergebnisse wurden durch eine Wiederholung der Untersuchung bestätigt.

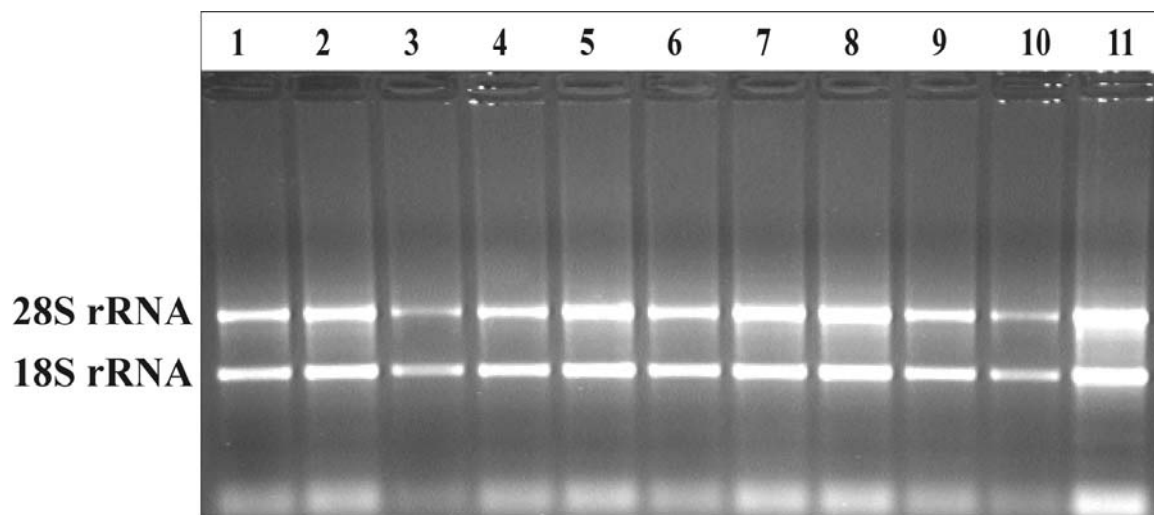
### 4.3 Untersuchung des Transkriptoms

Aufgrund der morphometrischen Daten, die an den Tieren der Altersgruppe 11 Wochen erhoben worden waren, wurde vermutet, dass es bei der negativen Wirkung von IGFBP-2 auf die GH-bedingte Hypertrophie der Zona fasciculata Zellen der Nebenniere Veränderungen im RNA-Expressionsprofil geben könnte. Mit Hilfe subtraktiver cDNA-Bibliotheken sollte untersucht werden, ob es differentiell exprimierte Gene zwischen den G- und GB- Tieren gibt.

#### 4.3.1 Herstellung von subtraktiven cDNA-Bibliotheken

Für die Herstellung der subtraktiven Banken wurde Gesamt-RNA aus den Nebennieren von jeweils 11 männlichen GH-transgenen und 11 männlichen doppeltransgenen Tieren der Altersgruppe 11 Wochen isoliert.

Die RNA wies zwei diskrete Banden auf, welche der 28S rRNA und der 18S rRNA entsprechen. Aus dem Verhältnis dieser Banden konnte geschlossen werden, dass RNA in ausreichender Qualität isoliert werden konnte. Neben den zwei deutlichen Banden ist die mRNA als Schmier im Hintergrund zu erkennen. Weiterhin wird am unteren Gelrand eine diffuse Bande nachgewiesen, welche kleine RNAs, wie z.B. tRNAs, die 5,8S und die 5S rRNA enthält.



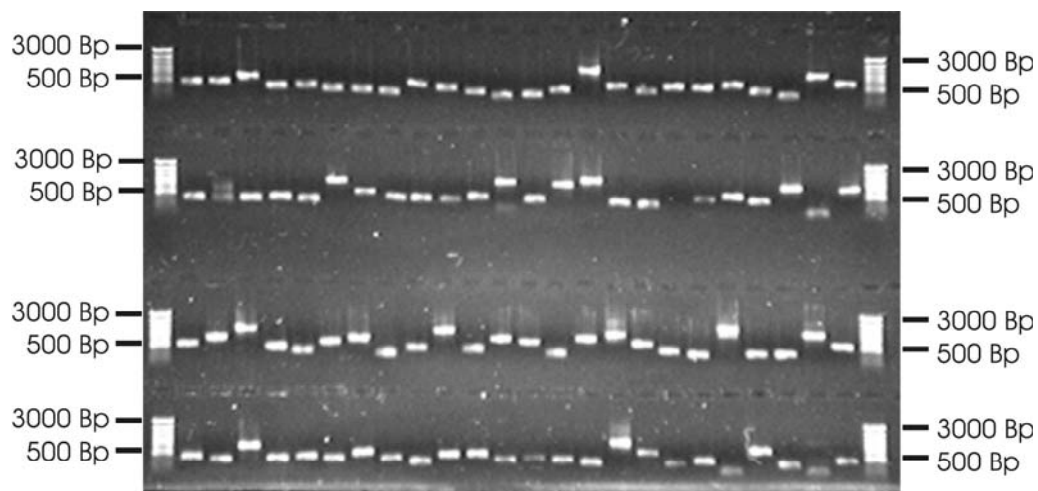
**Abbildung 11: Isolierung der Gesamt-RNA aus den Nebennieren von 11 Wochen alten Tieren. Die RNA wurde nach der Isolierung aus den Nebennieren in 50 µl Wasser gelöst. Davon wurde zur Analyse 1 µl in einem 1%igen Gel aufgetrennt.**

Die Mengen der isolierten Gesamt-RNA aus einem Nebennierenpaar lagen zwischen 9 und 34 µg. Davon sind 2 % bis 3 % mRNA, welche bei der nachfolgenden cDNA-Synthese umgeschrieben wird.

Die Herstellung der subtraktiven cDNA-Bibliotheken erfolgte jeweils aus einem Pool eines Teils der 11 Proben. Dafür wurden von der gelösten RNA aus jeder Probe 5 µg entnommen und nach Genotyp getrennt zusammengeführt. Diese Proben wurden anschließend in cDNA umgeschrieben und weiterbearbeitet. Es wurden zwei subtraktive cDNA-Bibliotheken erstellt zur Anreicherung von cDNAs von Genen, deren Expression in GH-transgenen Tieren bzw. in doppeltransgenen Tieren erhöht ist. Die Banken wurden durch Herrn Dr. Stefan Bauersachs

nach dem SSH-Verfahren erstellt (Bauersachs et al. 2003; Diatchenko et al. 1996; Diehl et al. 2005).

Für ein Vorscreening der Banken wurden jeweils 384 cDNA-Klone gepickt und die klonierten cDNA-Fragmente mittels PCR amplifiziert. Alle amplifizierten Produkte wurden durch Auftrennung in TBE-Agarosegelen (0,8 %) analysiert. Zur Analyse wurden 0,5 µl PCR-Produkt im Vergleich zu einem Längenstandard aufgetrennt. Abbildung 12 zeigt eine Gelanalyse von 96 Produkten aus der Kolonie-PCR. Die Länge der cDNA-Fragmente liegt zwischen 100 und 2000 Bp, Abbildung 12 ist in diesem Fall repräsentativ für alle analysierten Gele. Es wurden in diesem Fall nahezu alle eingesetzten cDNA-Fragmente erfolgreich amplifiziert. Insgesamt wurde von etwa 96 % der cDNA-Klone ein PCR-Produkt erhalten. Selten aufgetretene Doppelbanden könnten auf Doppelklone (zwei Klone in einer Kultur) hindeuten, aber auch von Abbruchprodukten in der PCR kommen. Die Amplifizierung ist für alle cDNA-Fragmente relativ gleichmäßig erfolgt, was an der ähnlichen Bandenintensität zu erkennen ist.

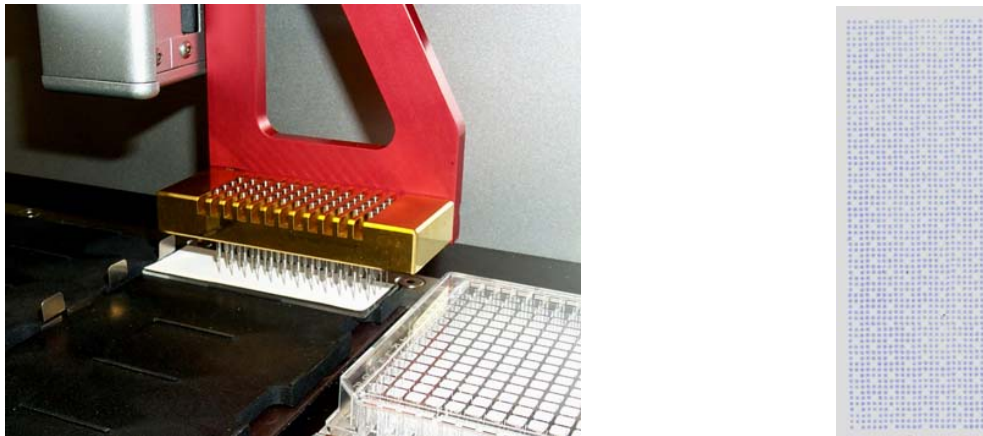


**Abbildung 12: Gelanalyse der Produkte aus der Kolonie-PCR. Es wurden 96 PCR-Produkte aus einer Kolonie-PCR aufgetrennt. In den äußeren Spuren wurden 100 ng des Molekulargewichtsstandard (100 bp plus) aufgetragen.**

#### 4.3.2 Herstellung von cDNA Arrays

Die amplifizierten cDNA-Fragmente wurden nach Übertragung der PCR-Produkte in 384-Well-Platten mittels eines Microarray Spotter auf Nylon-Membranen aufgedruckt (Abbildung 13). Für das Vorscreening wurden Arrays erstellt, die 384 Klone von jeder Bank beinhalteten. Für die Hauptuntersuchung wurden insgesamt 3072 Klone gespottet, davon aus jeder Bank 1536. Da auf einem Array in der Größe 50 x 20 mm maximal 1728 cDNA-Fragmente

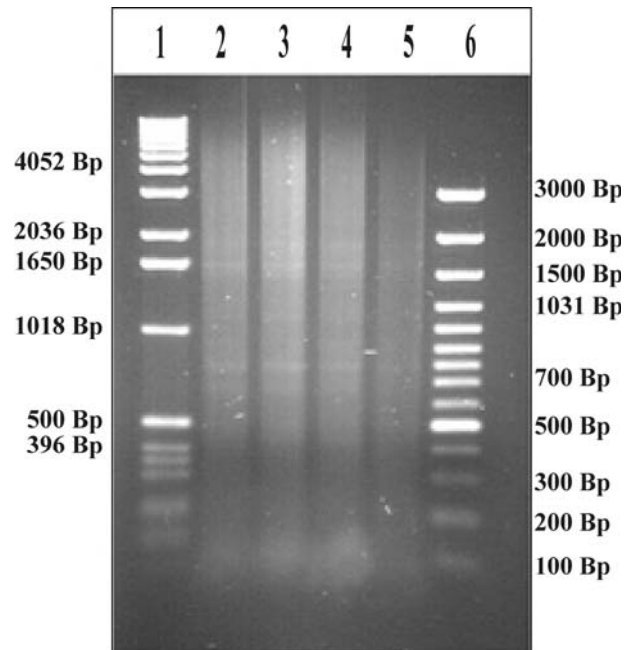
angeordnet werden können, wurden die 3072 cDNAs auf zwei Arrays verteilt. Jede Probe wurde 6-mal aufgetragen, um einen ausreichenden und gleichmäßigen Probenauftrag zu gewährleisten. Der Probenpuffer enthielt Bromphenolblau zur Sichtbarmachung der Spots. Es wurden in zwei Spotvorgängen gleichzeitig jeweils 20 Arrays hergestellt. Aus diesen wurden jeweils 6 für eine Hybridisierung ausgewählt.



**Abbildung 13: Herstellung von cDNA-Arrays. Links sind der Druckkopf des Spotters mit den 48 Pins, eine Nylon-Membran und eine 384-Well-Probenplatte zu sehen. Rechts ist ein fertiges Array abgebildet. Die Spots sind aufgrund des im Probenpuffer enthaltenen Farbstoff (Bromphenolblau) als blaue Punkte zu erkennen.**

### 4.3.3 cDNA-Array-Hybridisierung für 11 Wochen alte Tiere

Zunächst wurden die Arrays mit cDNA von 11 Wochen alten Tiere hybridisiert.



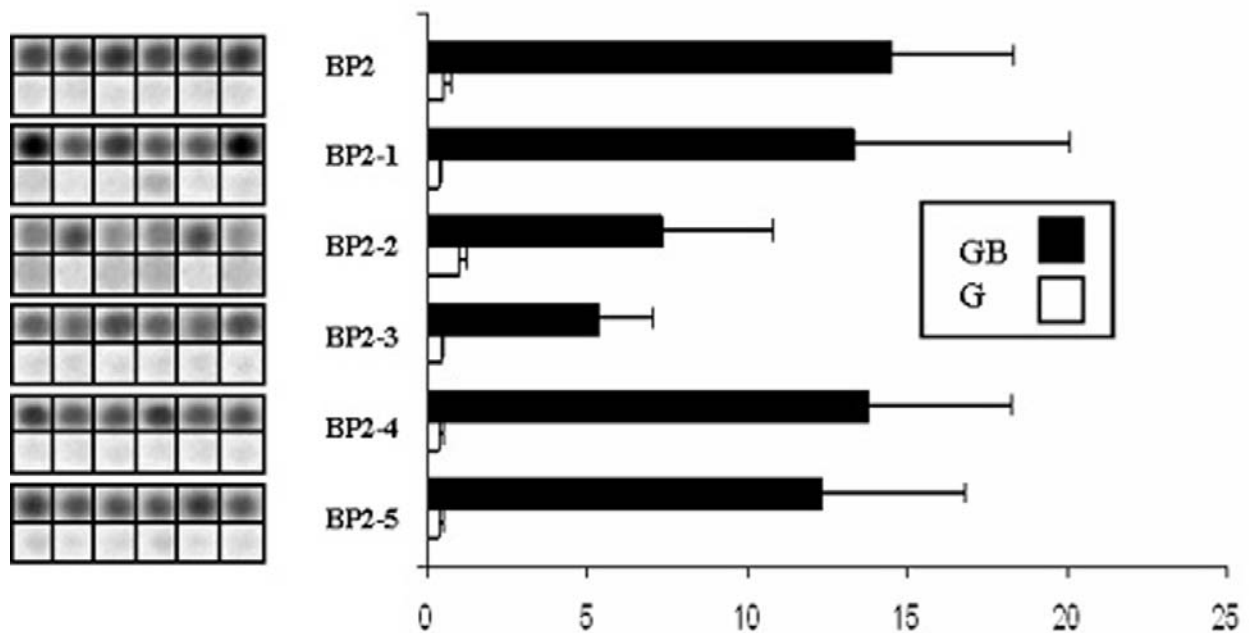
**Abbildung 14: Analyse der cDNA nach der Umschreibung aus Nebennieren RNA. Spur 1: kb Längenstandard (200 ng); Spuren 2 und 3: cDNAs von 2 G Tieren; Spuren 4 und 5: cDNAs von zwei GB Tieren; Spur 6: 100 Bp-Ladder-Plus (100 ng).**

Dafür wurde die RNA in cDNA umgeschrieben und diese anschließend gereinigt. Die Qualität der cDNA wurde nach der Umschreibung durch Agarosegelelektrophorese kontrolliert (Abbildung 14). Da cDNA aus vielen, sehr unterschiedlich langen Fragmenten besteht, wird sie über ein großes Spektrum aufgetrennt. Die gleichmäßige Verteilung über einen Bereich von etwa 100 Bp bis etwa 3000 Bp weist auf eine sehr gute Qualität der cDNA hin. Für das Vorscreening der subtraktiven cDNA-Bibliotheken wurden 384 Klone aus jeder Bank untersucht. Die Arrays wurden mit  $\alpha$ -[ $^{33}\text{P}$ ]-dCTP-markierten Sonden, die aus der cDNA von zwei G und zwei GB Tieren im Alter von 11 Wochen hergestellt worden waren, hybridisiert. Für die Hybridisierungen wurden die Proben derselben Tiere verwendet wie für die Erstellung der subtraktiven cDNA-Bibliotheken.

Diese Voruntersuchung sollte zeigen, ob in den subtraktiven cDNA-Bibliotheken cDNAs differentiell exprimierter Gene enthalten sind und wie hoch deren Anteil ist. Die Arrays wurden mit dem Phosphorimager ausgelesen und die Signale unter Verwendung der Aida Array Software ausgewertet. Mit Hilfe der Software wurde beurteilt, wie viele der Spots zwischen den Genotypen einen Unterschied mit dem Faktor 2 oder größer zeigten. Es konnten etwa 100 solcher cDNAs identifiziert werden. Es erfolgte aber an diesem Punkt keine Sequenzierung dieser cDNAs.

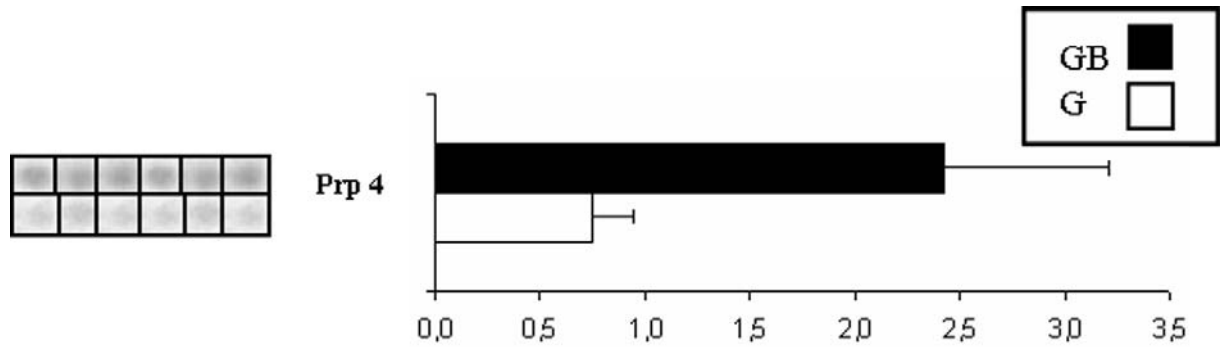
Anschließend wurden Arrays mit insgesamt 3072 cDNA Fragmenten mit cDNA Sonden von 6 G und 6 GB Tieren hybridisiert. Diese Hybridisierung wurde einmal wiederholt. Die radioaktiv markierten Arrays wurden über 12 h, 24 h und 48 h auf einen „Storage Phosphor Screen“ aufgelegt, welcher die Signale speichert. Diese wurden mit dem Phosphor Imager eingelesen und mit der AIDA Array Software ausgewertet. Es zeigte sich, dass für die Auswertung am besten die Arrays mit einer Expositionszeit von 24 h geeignet waren.

Zur Normalisierung der Daten auf das jeweilige Array wurde der Median über alle Werte eines Arrays gebildet und jeder einzelne Wert durch diesen geteilt. Auf diese Weise können die Werte der einzelnen Arrays optimal miteinander verglichen werden. Zum Test auf Signifikanz wurde ein Student'scher t-Test durchgeführt. Alle dargestellten Werte waren signifikant mit  $p < 0,01$  (Abbildungen 15, 16, 18, 19). Es wurden alle cDNAs sequenziert, die einen Unterschied um mindestens den Faktor 2 zwischen G und GB bei mindestens 4 der untersuchten Tiere jedes Genotyps innerhalb einer Altersgruppe aufwiesen. Insgesamt waren das 20 cDNA-Fragmente. Nach der ersten Sequenzierung fiel auf, dass 6 der analysierten cDNAs einem Teil der IGFBP-2 mRNA entsprachen.



**Abbildung 15: IGFBP-2 (BP2) Expression in 11 Wochen alten Tieren. Links in der Abbildung sind die entsprechenden Signale der Array-Hybridisierung dargestellt. Das Diagramm rechts zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung aus den Hybridisierungsexperimenten nach einer Normalisierung durch den Median und für N = 6. Der t-Test ergab p-Werte von < 0,01.**

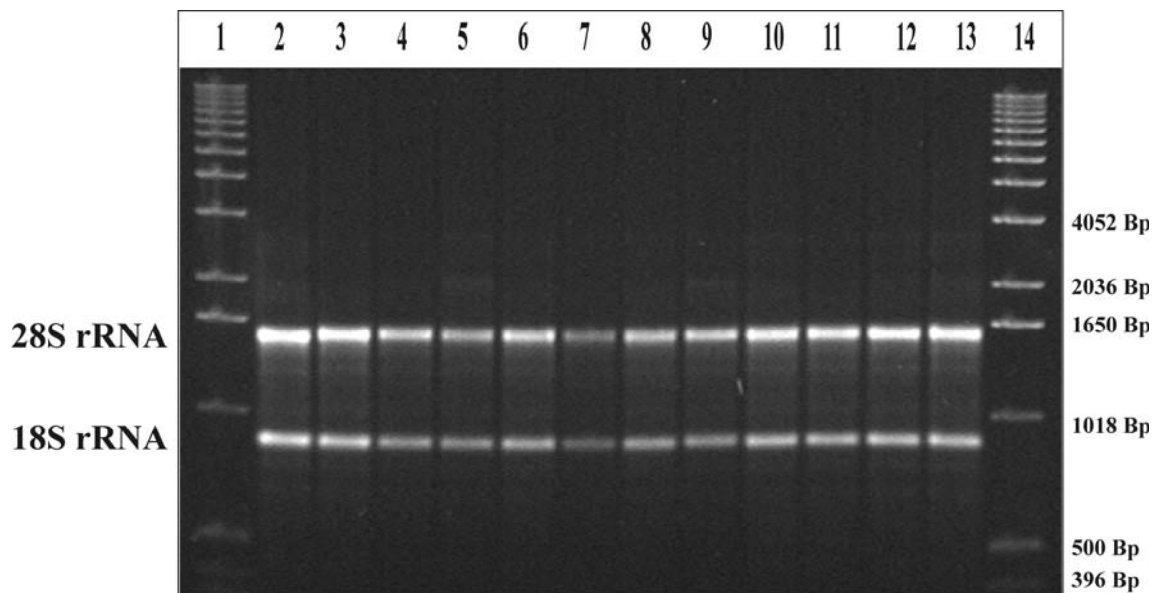
Die weiteren Hits der ersten Sequenzierung konnten sich in den Wiederholungshybridisierungen nicht bestätigen lassen, bis auf Prp4 als einzige Ausnahme (Abbildung 16). Bei Prp 4 handelt es sich um einen Bestandteil des Spleißosoms. Gleichzeitig besitzt Prp4 aber auch die Funktion einer Serin-Threonin Kinase und hat Strukturhomologien zu MAPK.



**Abbildung 16:** Expression von pre mRNA processing factor (Prp4) in den Nebennieren von 11 Wochen alten Tieren. Links in der Abbildung sind die entsprechenden Signale der Array-Hybridisierung dargestellt. Das Diagramm rechts zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung aus den Hybridisierungsexperimenten nach einer Normalisierung durch den Median und für N = 6. Der t-Test ergab p-Werte von < 0,01.

#### 4.3.4 cDNA-Array-Hybridisierung für die 38 Tage alten Tiere

Anschließend erfolgte nach dem selben Verfahren eine Hybridisierung der bestehenden cDNA-Arrays mit Proben, die aus den Nebennieren 38 Tage alter Tiere gewonnen wurden.

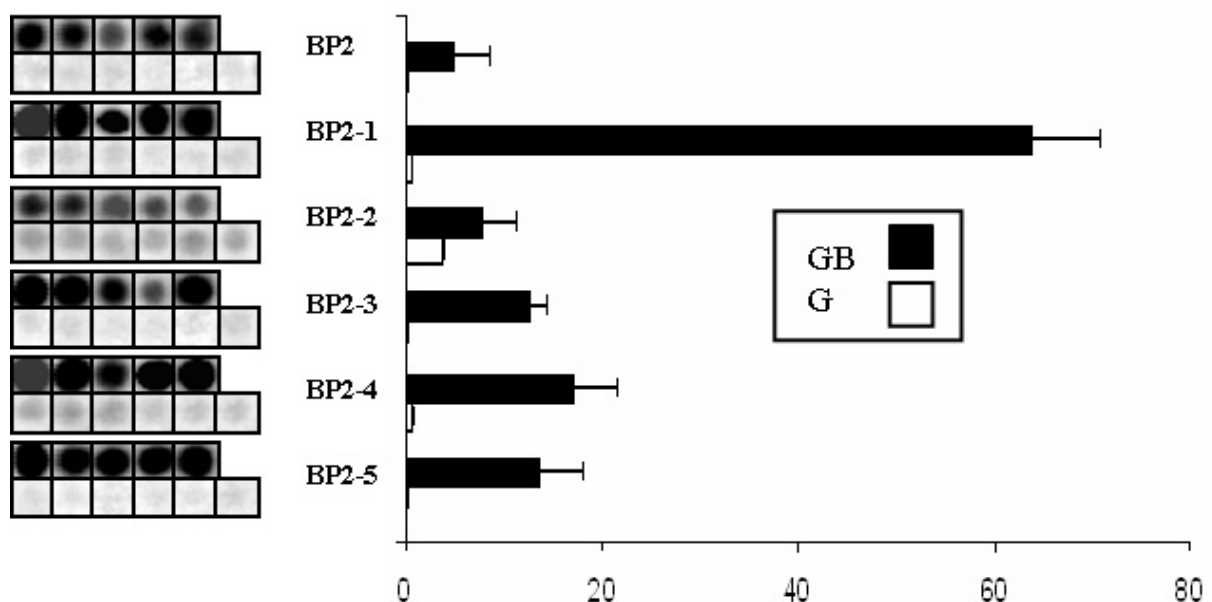


**Abbildung 17:** Isolierung der Gesamt-RNA aus den Nebennieren der 38 Tage alten GH und doppeltransgenen Tiere. In der ersten und letzten Spur wurden 100 ng Puc Mix 8 Längenstandard aufgetragen. Dann folgen 6 Spuren mit der Gesamt-RNA der G Tiere und dann 6 Spuren mit der Gesamt-RNA der GB Tiere. Es wurde 1 µl RNA-Lösung aufgetragen.



Es konnten zwischen 12 und 50 µg Gesamt-RNA isoliert werden. Es wurden von den G Tieren 5 α-[<sup>33</sup>P]-dCTP-markierte cDNA-Proben und von den GB Tieren 6 α-[<sup>33</sup>P]-dCTP-markierte cDNA-Proben eingesetzt. Die Hybridisierung wurde einmal wiederholt. In beiden Altersgruppen wurde Gesamt-RNA für die Umschreibung in cDNA eingesetzt. Bei den 11 Wochen alten Tieren wurde immer die gesamte RNA-Menge in cDNA umgeschrieben. Anhand der Gelanalyse der cDNA wurde dann versucht vergleichbare cDNA Mengen für die Hybridisierung einzusetzen. Bei den Tieren im Alter von 38 Tagen wurden immer genau 12,5 µg der Gesamt-RNA umgeschrieben, anschließend in 10 µl Flüssigkeit gelöst und davon 3 µl für eine Hybridisierung eingesetzt.

Die Hybridisierung und Auswertung der Spots erfolgte analog wie unter 4.3.3 beschrieben. Die bereits gefundenen Gene wurden bestätigt. Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse für die IGFBP-2-Fragmente.



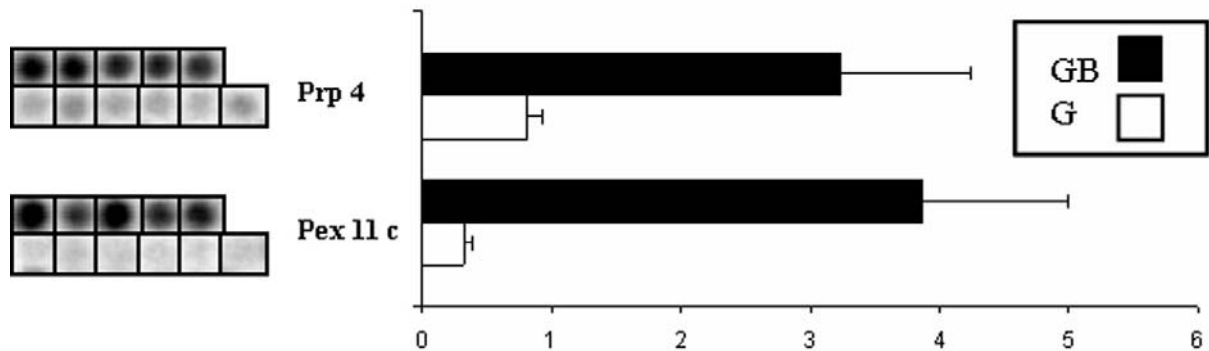
**Abbildung 18: IGFBP-2 (BP2) mRNA Expression in 38 Tage alten Tieren.** Links in der Abbildung sind die entsprechenden Signale der Array-Hybridisierung dargestellt. Das Diagramm rechts zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung aus den Hybridisierungsexperimenten nach einer Normalisierung durch den Median. Bei den GB Tieren wurden die Hybridisierungen mit N = 5 und bei den G Tieren mit N = 6 durchgeführt. Der t-Test ergab p-Werte von < 0,01.

Auch Prp4 konnte erneut identifiziert werden. Eine weitere cDNA mit einem Unterschied über Faktor 2 bei allen Vergleichen wurde identifiziert. Auf dem Agarosegel und auch bei der Sequenz ist zu erkennen, dass es sich dabei um einen Doppelklon (2 cDNA-Fragmente)

handelt. Die Sequenzen der beiden cDNA-Fragmente sind unterschiedlich lang, so dass nur die längere Sequenz zum Teil lesbar war und als Pex11c identifiziert werden konnte.

Prp4 und Pex11 c waren ebenso wie IGFBP-2 in den GB Tieren hochreguliert.

In Tabelle 13 sind die drei eindeutig als differentiell exprimiert identifizierten Gene aufgelistet. Es wurde ihre Bezeichnung aus der Genbank, die Accessionnummer und die Homologie zwischen unserer Sequenz und dem Datenbankeintrag eingetragen.



**Abbildung 19: Expression von Prp 4 (pre mRNA processing factor) und Peroxisomal biogenesis factor 11 c (Pex11c) in 38 Tage alten Tieren. Links in der Abbildung sind die entsprechenden Signale der Array-Hybridisierung dargestellt. Das Diagramm rechts zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung aus den Hybridisierungsexperimenten nach einer Normalisierung durch den Median. Bei den GB Tieren wurden die Hybridisierungen mit N = 5 und bei den G Tieren mit N = 6 durchgeführt. Der t-Test ergab p-Werte von < 0,01.**

**Tabelle 11: Gene mit signifikanten Expressionsunterschieden zwischen G und GB**

Genbank-Eintrag	Genbank Accession number	Homologie (%)
Mus musculus Insulin-like growth factor binding protein 2 (mIGFBP-2)	BC012724	100
U4/U6 Small nuclear Ribonucleoprotein HPRP4 Homolog [Homo sapiens]	AK005464	100
Mus musculus Peroxisomal Biogenesis Faktor 11c (Pex11c)	NM_026951.1	99

### 4.3.5 Untersuchung der Gene mit Hilfe von quantitativer PCR

Die qPCR wurde durchgeführt, um die Ergebnisse aus der Array-Hybridisierung zu überprüfen. Dafür wurde aus den Nebennieren von 11 Wochen und von 38 Tage alten Tieren die RNA isoliert. Untersucht wurden G und GB Tiere. Die Ergebnisse der C Tiere wurden zur Kalibrierung der Werte verwendet. Von den 11 Wochen alten Tieren wurden jeweils 3 Tiere untersucht und von den 38 Tage alten Tieren 3 C, 3 GB Tiere und 2 G Tiere. Nach der Isolierung der RNA und nach dem DNase Verdau wurden 2 %ige TBE-Agarosegele angefertigt und nur RNA, die keine Degradation aufwies, für die Umschreibung in cDNA verwendet. Untersucht wurde Prp4 bei den 11 Wochen alten Tieren und Prp4 und Pex11c bei den 38 Tage alten Tieren. Als Housekeeping Gen wurde  $\beta$ -Aktin verwendet.

#### 4.3.5.1 Vorbereitung für die Untersuchung

Die isolierte RNA wurde mit DNase verdaut, um eine mögliche Verunreinigung mit genomischer DNA zu vermeiden. Eine zusätzlich durchgeführte Test-PCR, in der genomische DNA im Vergleich mit cDNA eingesetzt wurde, diente zur Ermittlung der Primerkombinationen, die eine Amplifizierung nur ausgehend von cDNA ermöglichten. Von der RNA vor und nach dem DNase Verdau wurde ein 2 %iges TBE-Agarosegel angefertigt, um die Qualität zu überprüfen. Anschließend erfolgte eine UV-Messung. Dafür wurden 400 ng Gesamt-RNA in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l in cDNA umgeschrieben.

#### 4.3.5.2 Standardkurven

Vor der eigentlichen qPCR erfolgte die Erstellung von Standardkurven. Diese ermöglichen nach der qPCR die Berechnung der ursprünglich eingesetzten Kopienzahl. Zunächst wurde das in der Test-PCR gewonnene PCR-Produkt in einen Plasmid-Vektor kloniert (pCR®2.1-TOPO). Die Plasmid-DNA wurde in ein Bakterium eingeschleust, dort vermehrt und anschließend die Plasmid-DNA isoliert.

Die Konzentration der gewonnenen Plasmid-DNA wurde durch UV-Messung bestimmt und anhand der gemessenen Menge die Anzahl der enthaltenen Plasmide bestimmt. Die Konzentration wurde auf 1 Million Plasmide pro  $\mu$ l verdünnt und davon ausgehend eine Verdünnungsreihe in 7 Schritten bis zu 640 Plasmiden/ $\mu$ l erstellt. Nach der Linearisierung durch ein Restriktionsenzym wurde eine qPCR durchgeführt. Aus den gewonnenen Werten wurde eine Standardkurve für Prp4, Pex11c und  $\beta$ -Aktin (Abbildung 20; Abbildung 21; Abbildung 22) erstellt.

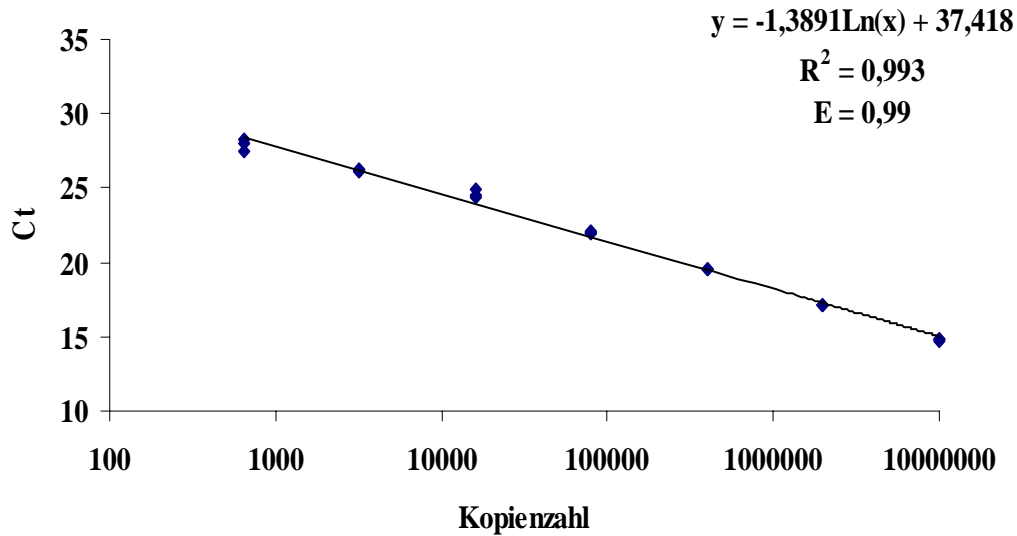


Abbildung 20: Standardkurve für das Gen Prp 4 über 7 Verdünnungsstufen. Auf der Y-Achse ist der Ct-Wert aufgetragen und auf der X-Achse die Kopienzahl der eingesetzten Plasmide. y gibt die Steigung der Geraden an und  $R^2$  die Korrelation der Werte. E gibt die Effizienz der Amplifizierung wieder.

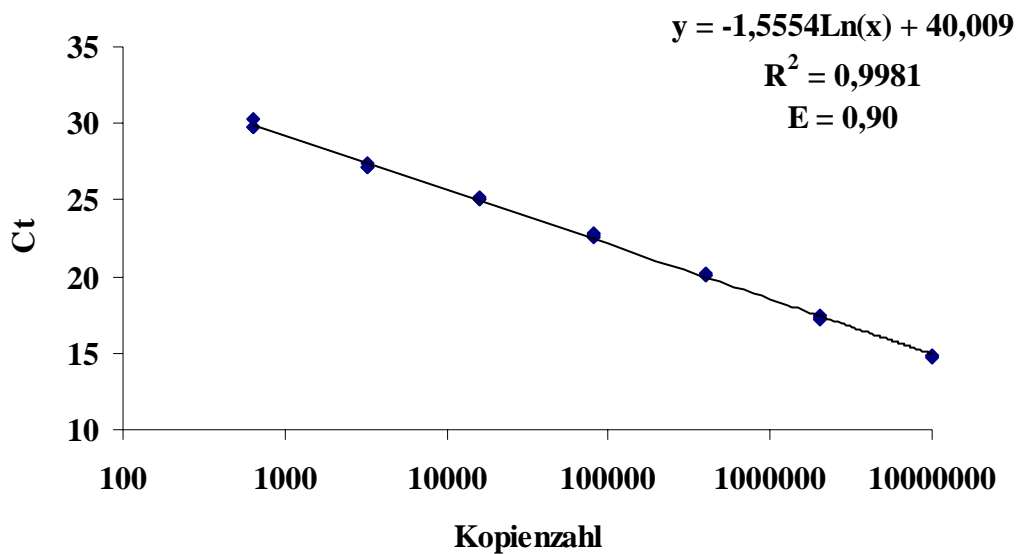


Abbildung 21: Standardkurve für das Gen Pex11 c über 7 Verdünnungsstufen. Auf der Y-Achse ist der Ct-Wert aufgetragen und auf der X-Achse die Kopienzahl der eingesetzten Plasmide. y gibt die Steigung der Geraden an und  $R^2$  die Korrelation der Werte. E gibt die Effizienz der Amplifizierung wieder.

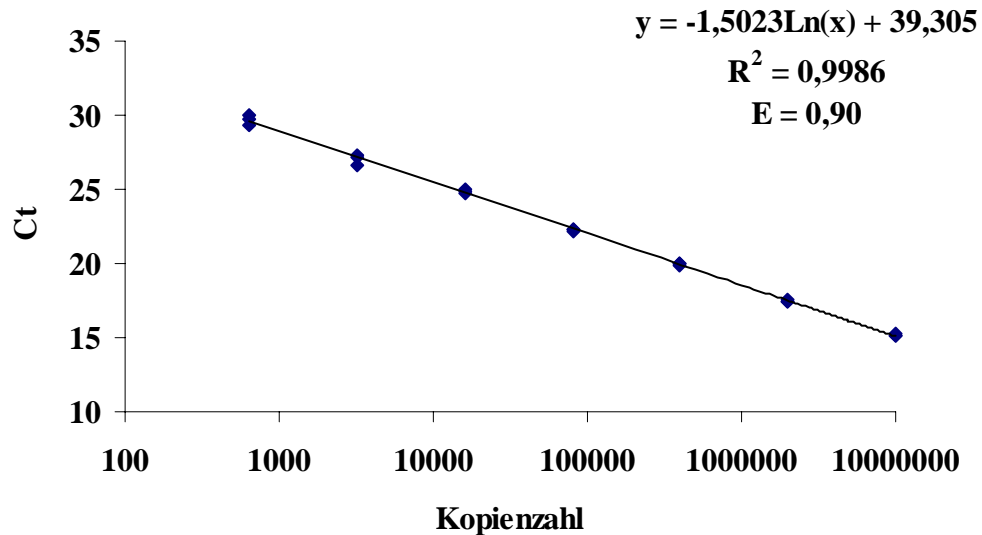


Abbildung 22: Standardkurve für das Gen  $\beta$ -Aktin über 7 Verdünnungsstufen. Auf der Y-Achse ist der Ct-Wert aufgetragen und auf der X-Achse die Kopienzahl der eingesetzten Plasmide.  $y$  gibt die Steigung der Geraden an und  $R^2$  die Korrelation der Werte.  $E$  gibt die Effizienz der Amplifizierung wieder.

#### 4.3.5.3 Prp4 in 5 Wochen alten Tieren

Für die qPCR wurden Triplikate von jeder cDNA eingesetzt.

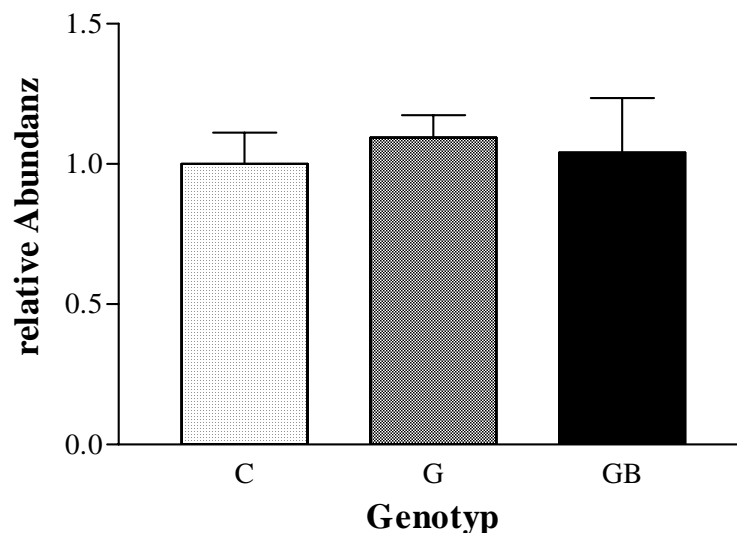
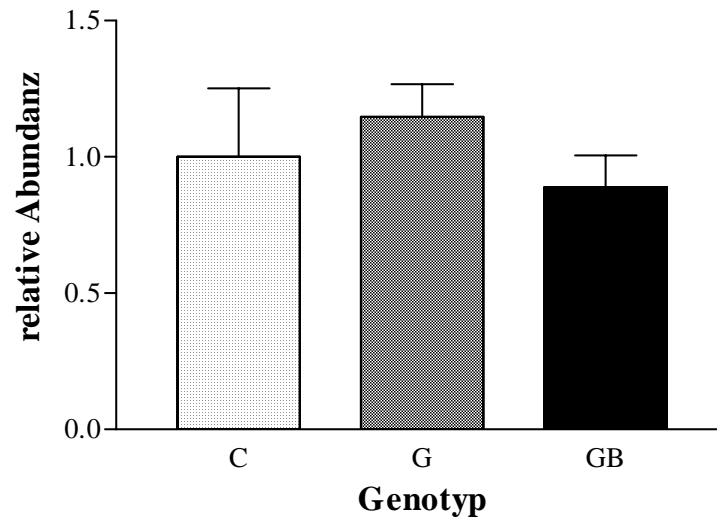


Abbildung 23: Kalibrierte Mittelwerte (mean  $\pm$  SD) nach der qPCR für das Gen PRP4 in 5 Wochen alten Tieren (N=3 in GB und C; N=2 in G).

In der qPCR für Prp4 in 5 Wochen alten Tieren wurden keine signifikanten Unterschiede in der Expression zwischen den untersuchten Genotypen festgestellt.

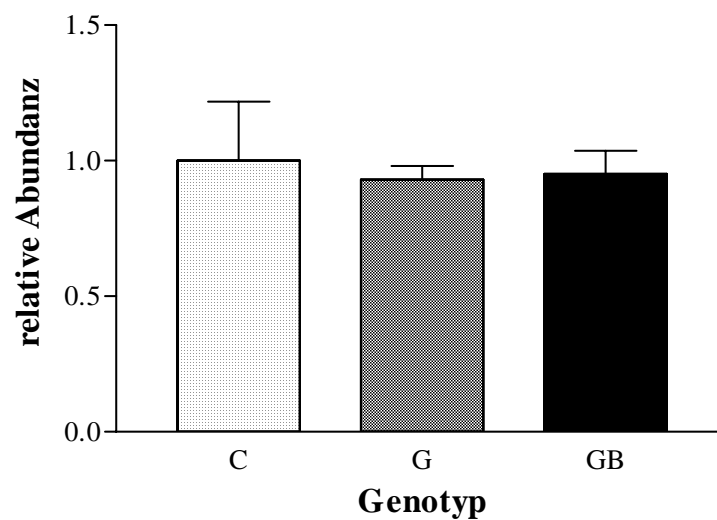
#### 4.3.5.4 Prp4 in 11 Wochen alten Tieren



**Abbildung 24:** Kalibrierte Mittelwerte (mean ± SD) nach der qPCR für das Gen Prp4 in 11 Wochen alten Tieren (N=3).

In der qPCR für Prp4 in 38 Tage alten Tieren wurden keine signifikanten Unterschiede in der Expression zwischen den untersuchten Genotypen festgestellt.

#### 4.3.5.5 Pex11c in 5 Wochen alten Tieren



**Abbildung 25:** Kalibrierte Mittelwerte (mean ± SD) nach der qPCR für das Gen Pex11c in 5 Wochen alten Tieren (N=3 in GB und C; N=2 in G).

In der qPCR für Pex11c in den 38 Tage alten Tieren wurden keine signifikanten Unterschiede in der Expression zwischen den untersuchten Genotypen festgestellt.

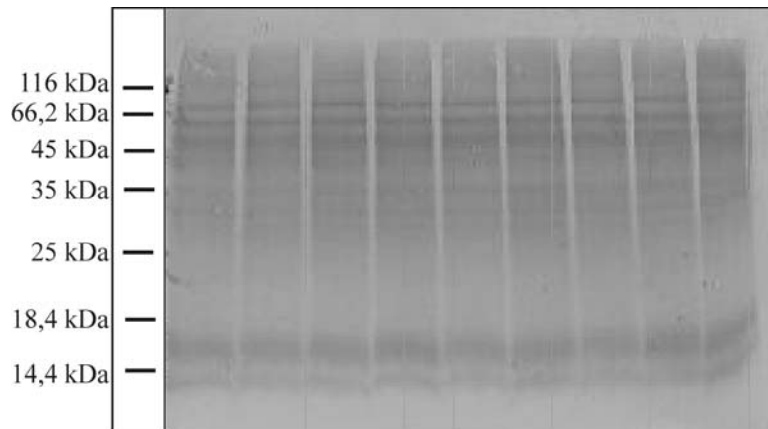
#### 4.4 Untersuchung der Proteine

Ergänzend zur Untersuchung des Transkriptoms wurde die Aktivierung bekannter Signalkaskaden untersucht. Der Schwerpunkt der Untersuchung wurde auf Faktoren aus dem PI3K-Weg gelegt. Faktoren dieses Weges sind alle in verschiedenen Untersuchungen als Einflussfaktoren auf Wachstum und Zellteilung identifiziert worden. Daher kann man vermuten, dass Veränderungen in diesem Weg, zu den beobachteten phänotypischen Veränderungen zwischen den G und GB Tieren führten. Es wurden Westernimmunoblots angefertigt. Auf die Membran wurde 5 µg Proteinlysate pro Spur aus den Nebennieren aufgetragen und mit spezifischen Antikörpern gegen verschiedene Faktoren inkubiert. Die Verwendung eines peroxidasegekoppelten zweiten Antikörpers ermöglichte eine Visualisierung der gebundenen Menge. Durch Verwendung eines mercaptoethanol-haltigen Elutionspuffers, konnten die Antikörper wieder entfernt werden und die Membran erneut zum Einsatz kommen.

Untersucht wurden alle 4 Genotypen. Im Alter von 11 Wochen wurden 6 männliche Tiere pro Genotyp untersucht, im Alter von 38 Tagen 3 männliche Tiere pro Genotyp.

##### 4.4.1 Coomassiefärbung

Für die Westernimmunoblotuntersuchung der Proteine wurden zunächst nach Konzentrationsbestimmung 5 µg Gesamtprotein auf ein SDS-Gel aufgetragen. Dieses wurde von dem Gel auf eine ImmobilonP-PVDF-Membran transferiert. Der Erfolg des Transfers und ein gleichmäßiger Proteinauftrag wurde durch Coomassiefärbung der ImmobilonP-PVDF-Membran nach dem Blotten überprüft. Auf der Abbildung 26 kann man deutlich das übertragene und gefärbte Protein erkennen. Zu diesem Zeitpunkt sind auch die Banden des Längenstandards deutlich zu erkennen. Sie werden mit einem wasserfesten Stift markiert, denn das Coomassie Blue wird bei den anschließenden Waschschritten wieder entfernt.



**Abbildung 26: Darstellung einer Coomassiefärbung nach einem erfolgreichen Proteintransfer von einem SDS-Gel auf eine ImmobilonP-PVDF-Membran. Rechts sind die Banden des Proteinmolekulargewichtsstandard aufgetragen.**

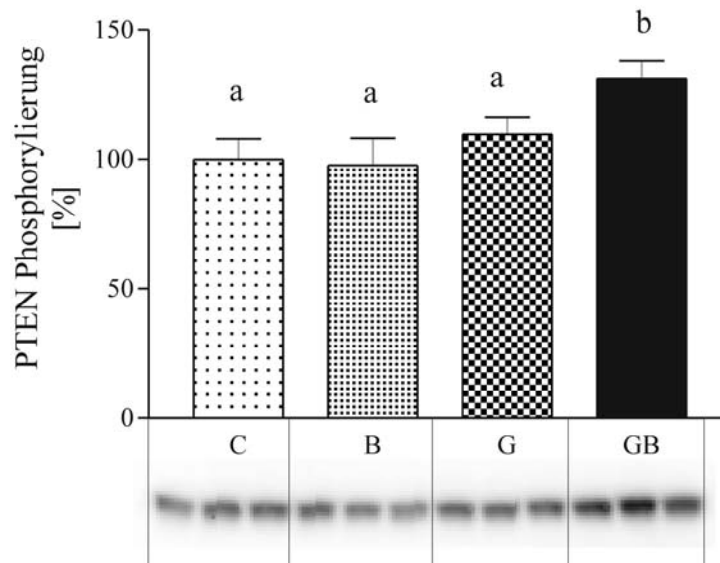
Diese Membranen wurden jetzt für Westernimmunoblots eingesetzt. Es wurden verschiedene Komponenten des PI3K-Weges untersucht. Dafür wurden bei jedem Westernblot für jeden Genotyp drei Proben aus drei Tieren übertragen. Alle Untersuchungen wurden einmal wiederholt.

#### 4.4.2 Signaluntersuchung PI3K-Weg

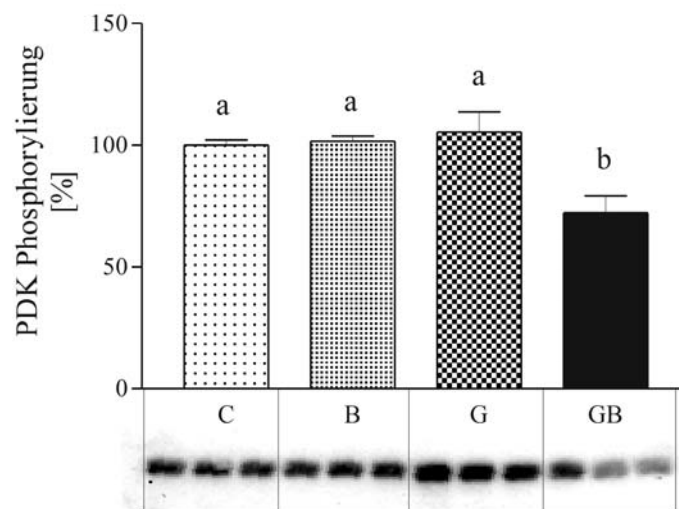
##### 4.4.2.1 Analyse der 11 Wochen alten Tiere

Vor allem der PI3K-Weg ist ein Kandidat, der für die Kontrolle von Zellgrößen in verschiedenen Untersuchungssystemen relevant ist. Zunächst wurde die Aktivierung der Phosphatase PTEN untersucht. Diese Phosphatase wirkt im PI3K-Weg als negativer Regulator und kontrolliert die Aktivierung von PDK1. Die Aktivierung von PTEN war bei den 11 Wochen alten GB Tieren signifikant erhöht im Vergleich zu den anderen drei Genotypen (G, C, B). Die Aktivierung der PDK1 war in den GB transgenen Mäusen signifikant vermindert. Diese Verminderung der PDK1 Aktivität ist wahrscheinlich auf eine Aktivität der Phosphatase PTEN zurückzuführen.





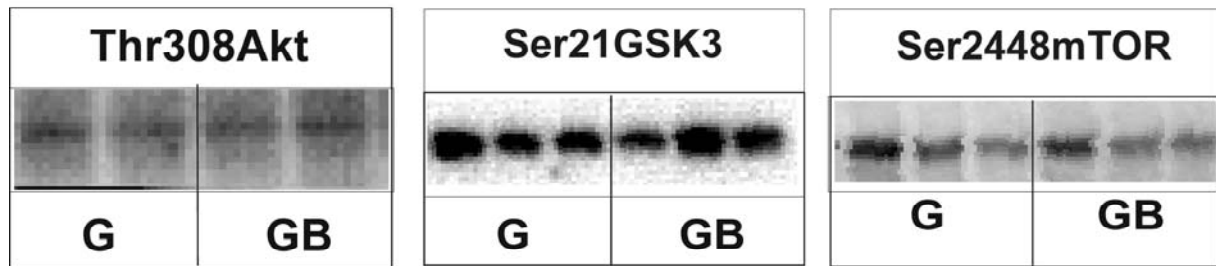
**Abbildung 27: Phosphorylierung von PTEN in Gewebeextrakten aus der Nebenniere von nicht transgenen (C), IGFBP-2 (B), GH (G) und doppelt transgenen (GB) 11 Wochen alten Mäusen. Die Balkengrafik zeigt jeweils Mittelwerte (N=6,  $\pm$ SEM), das Insert darunter zeigt einen Ausschnitt aus einem repräsentativen Blot.**



**Abbildung 28: Phosphorylierung von PDK1 in Gewebeextrakten aus der Nebenniere von nicht transgenen (C), IGFBP-2 (B), GH (G) und doppelt transgenen (GB) von 11 Wochen alten Mäusen. Die Balkengrafik zeigt jeweils Mittelwerte (N=6,  $\pm$ SEM), das Insert darunter zeigt einen Ausschnitt aus einem repräsentativen Blot.**

Bei der Untersuchung der Aktivierung etablierter Substrate von PDK1 konnten wir jedoch keine Veränderungen feststellen. Als Hauptkandidaten in dieser Untersuchung wählten wir

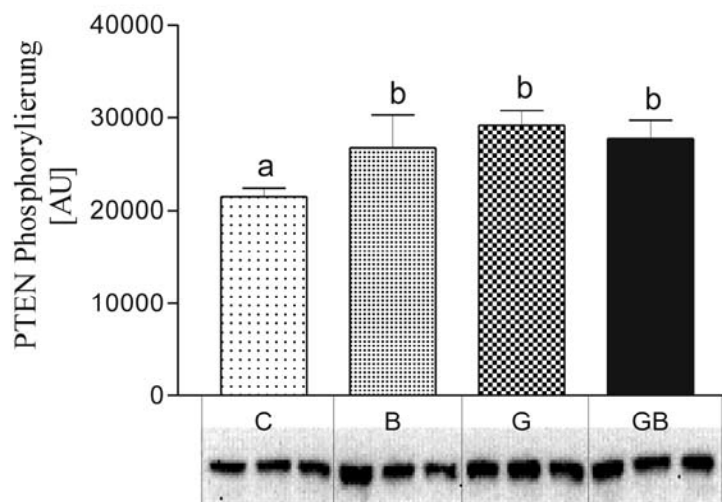
Akt (Thr308), da es als Hauptsubstrat von PDK1 im PI3K-Weg gilt. GSK-3 und mTOR wurden ebenfalls untersucht, da auch sie unter der Kontrolle von PDK1 stehen.



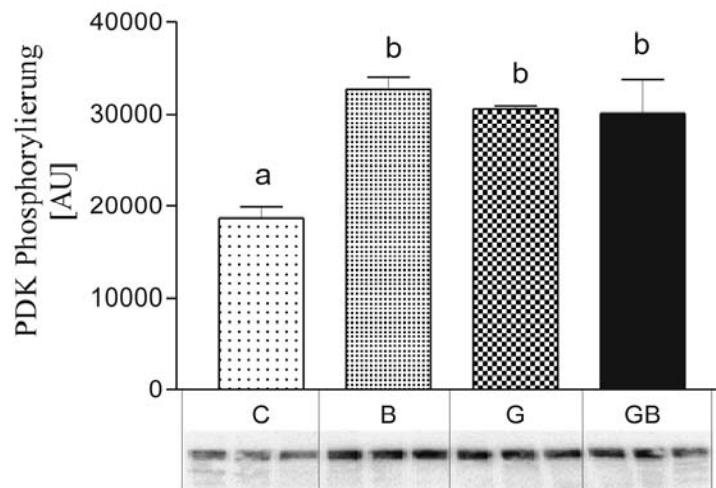
**Abbildung 29: Phosphorylierung von Akt (Thr 308), pGSK3 und pmTOR in Gewebeextrakten aus der Nebenniere von nicht transgenen (C), IGFBP-2 (B), GH (G) und doppelt transgenen (GB) Mäusen. Die Graphik zeigt entsprechende Ausschnitte aus den jeweiligen Westernimmunoblots.**

#### 4.4.2.2 Analyse der 38 Tage alten Tiere

Auch in den 38 Tage alten Tieren untersuchten wir die Aktivierung von PTEN und PDK1. Allerdings konnten wir hier keine Unterschiede in der Aktivierung zwischen den G und GB Tieren feststellen.



**Abbildung 30: Phosphorylierung von PTEN in Gewebeextrakten aus der Nebenniere von nicht transgenen (C), IGFBP-2 (B), GH (G) und doppelt transgenen (GB) 38 Tage alten Mäusen. Die Balkengrafik zeigt jeweils Mittelwerte (N=3,  $\pm$ SEM), das Insert darunter zeigt den dazugehörigen Westernimmunoblot.**



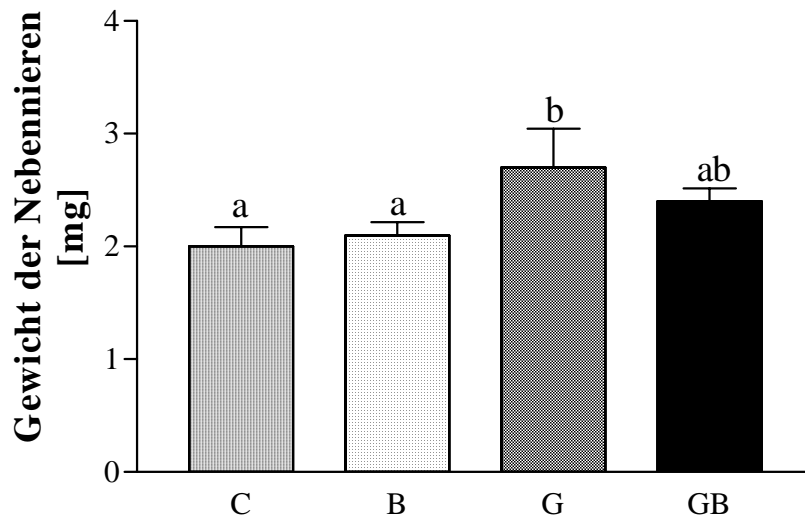
**Abbildung 31: Phosphorylierung von PDK1 in Gewebeextrakten aus der Nebenniere von nicht transgenen (C), IGFBP-2 (B), GH (G) und doppelt transgenen (GB) 38 Tage alten Mäusen. Die Balkengrafik zeigt jeweils Mittelwerte (N=3,  $\pm$ SEM), das Insert darunter zeigt den dazugehörigen Westernimmunoblot.**

## 4.5 Quantitativ-stereologische Nebennierenbefunde

### 4.5.1 Gewicht der Nebennieren

Für die Vermessung der Nebennieren der 38 Tage alten Tiere wurden 12 männliche Tiere verwendet, drei von jedem Genotyp. Für die Bestimmung des Gesamtvolumens und der Volumenanteile der einzelnen Zonen wurde die linke Nebenniere verwendet. Für die Bestimmung der Zellzahl und Zellgröße wurde die rechte Nebenniere verwendet.

Das Gewicht der Nebennieren war in den G und GB Tieren signifikant erhöht im Vergleich mit den nichttransgenen Kontrollen (Abbildung 32). In den G Tieren war das Gewicht um 28 % erhöht und in den GB Tieren um 23 %.

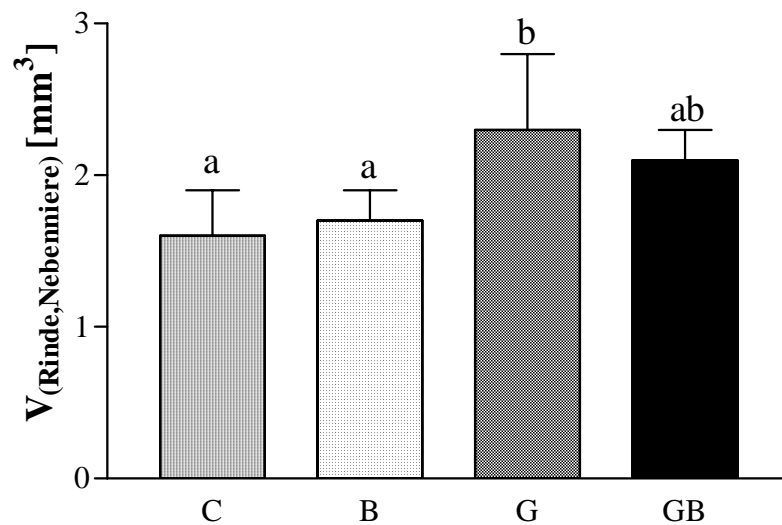


**Abbildung 32: Gewicht der Nebennieren der 38 Tage alten Mäuse aller 4 Genotypen.** Dargestellt sind die Mittelwerte der einzelnen Nebennieren (mean ± SD; N = 3). Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

#### 4.5.2 Volumen der Nebennierenrinde

Die Volumendichten der Nebennierenrinde ( $V_{V(Rinde/Nebenniere)}$ ) und die Volumendichten des Nebennierenmark ( $V_{V(Mark/Nebenniere)}$ ) lagen zwischen 82 % und 89 % beziehungsweise zwischen 11 % und 18 % und unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (nicht abgebildet). Die G und GB Tiere zeigten einen leicht erhöhten Rindenanteil im Vergleich mit den C und B Tieren. Im Mark waren die Verhältnisse entsprechend.

Das absolute Volumen der Rinde ( $V_{(Rinde,Nebenniere)}$ ) war in den G Mäusen um 32 % höher als in den C Mäusen und in den GB Mäusen 29 % größer als in den C Mäusen (Abbildung 33). Diese Unterschiede waren signifikant ( $p < 0,05$ ). In den GB Mäusen war es um 10 % niedriger als in den G Tieren, aber dieser Wert war nicht signifikant ( $p < 0,05$ ). Das absolute Volumen des Nebennierenmark ( $V_{(Mark,Nebenniere)}$ ) war in allen vier Gruppen identisch (nicht abgebildet).

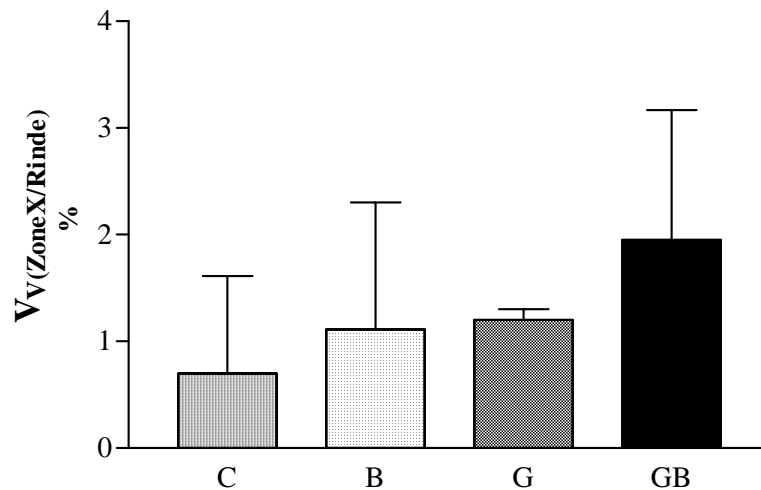


**Abbildung 33: Volumen der Nebennierenrinde ( $V_{\text{(Rinde, Nebenniere)}}$ ). Die Nebennierenrinde ist in den G und GB Tieren im Vergleich mit den nichttransgenen Kontrollen vergrößert. Zwischen den G und GB Tieren besteht kein signifikanter Unterschied ( $\text{mean} \pm \text{SD}$ ;  $N = 3$ ). Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.**

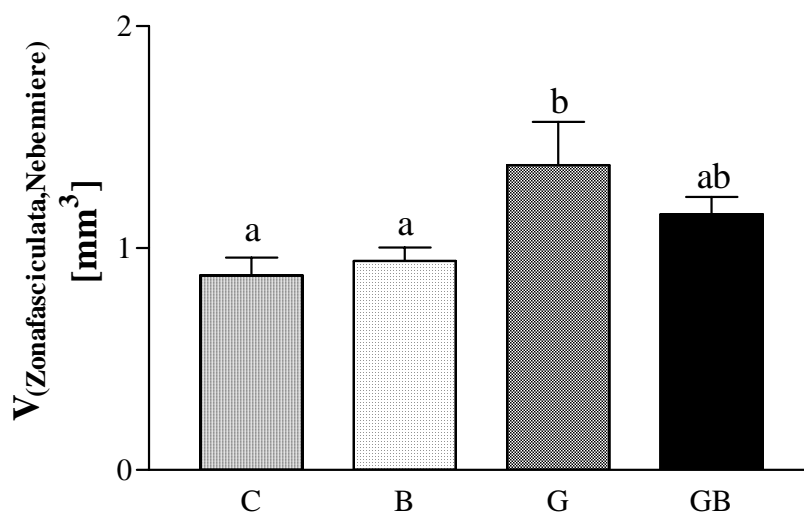
#### 4.5.3 Volumen von Zona fasciculata, Zona glomerulosa und Zone X

Bei der ersten Beurteilung der Nebennierenschnitte fiel um das Mark herum eine Zone auf, deren Zellen stark vakuolisiert waren. Vergleiche mit Abbildungen aus der Literatur legen nahe, dass es sich dabei um letzte Reste der beschriebenen Zone X handelt. Dieser Befund widerspricht der Literatur, denn eigentlich ist die Zone X bei männlichen Mäusen nach spätestens 5 Wochen nicht mehr vorhanden (Firth 1983).

Die Mittelwerte der Volumenanteile der Zona fasciculata ( $V_{\text{V(Zona fasciculata/Rinde)}}$ ) lagen zwischen 52 % und 61 % (nicht abgebildet), die der Zona glomerulosa ( $V_{\text{V(Zona glomerulosa/Rinde)}}$ ) zwischen 36 % und 46 % (nicht abgebildet) und die der Zone X ( $V_{\text{V(Zone X/Rinde)}}$ ) zwischen 0 % und 2,7 % (Abbildung 34). Nur G zeigte einen signifikant höheren Anteil an  $V_{\text{V(Zona fasciculata/Rinde)}}$  und  $V_{\text{V(Zona glomerulosa/Rinde)}}$ . Die Kontrollgruppe zeigte den geringsten Anteil an Zone X im Vergleich zu den anderen 3 Gruppen, allerdings waren diese Unterschiede nicht signifikant ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 34: Volumendichte der Zone X ( $V_V(\text{Zone X/Nebenniere})$ ) der Nebenniere.  $V_V(\text{Zone X/Nebenniere})$  ist in den nichttransgenen Kontrollen am niedrigsten (mean  $\pm$  SD; N = 3).**



**Abbildung 35: Absolutes Volumen der Zona fasciculata der Nebennieren ( $V(\text{Zona fasciculata, Nebenniere})$ ). ( $V(\text{Zona fasciculata, Nebenniere})$ ) ist in den G und GB Tieren im Vergleich mit den nichttransgenen Kontrollen vergrößert. Zwischen den G und GB Tieren besteht kein signifikanter Unterschied (mean  $\pm$  SD; N = 3). Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.**

Das absolute Volumen der Zona fasciculata ( $V(\text{Zona fasciculata, Nebenniere})$ ), war in G im Vergleich zu C um 56 % erhöht und in GB im Vergleich zu C um 20 % (Abbildung 35). Damit lag

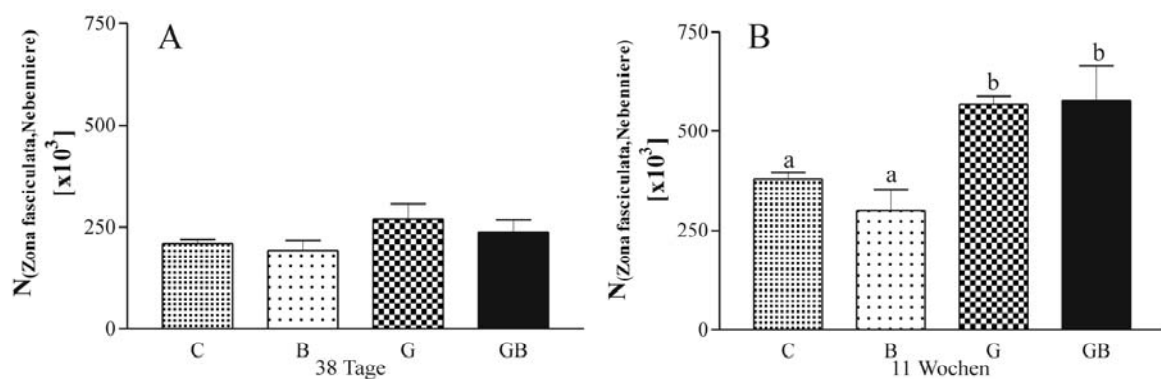
$V_{(Zona\ fasciculata, Nebenniere)}$  der GB Tiere intermediär zwischen G und C, allerdings war der Unterschied von G zu GB nicht signifikant ( $p < 0,05$ ).

Die absoluten Volumina der Zona glomerulosa ( $V_{(Zona\ glomerulosa, Rinde)}$ ) wiesen zwischen den G und den C Tieren einen Unterschied von 26 % und zwischen GB und C einen von 23 % (nicht abgebildet, nicht signifikant).

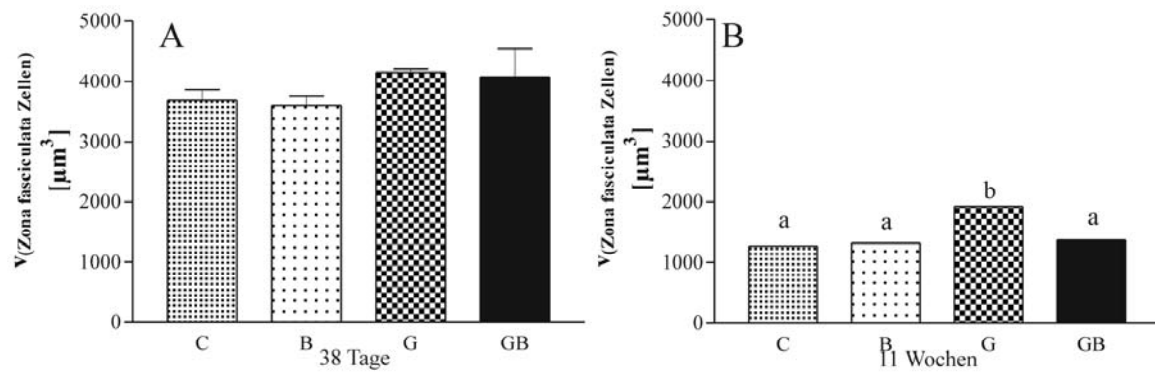
#### 4.5.4 Mittleres Volumen und Zahl der Zona fasciculata Zellen

Für die Bestimmung des mittleren Volumens und der Anzahl der Zona fasciculata Zellen wurden, die in Epon eingebetten rechten Nebennieren verwendet.

Im Mittel wurden auf den 7 Disektorpaaren 67 Q<sup>-</sup> ermittelt. Die Spanne lag zwischen 53 und 79 gezählten Kernen. Die absolute Zellzahl ( $N_{(Zona\ fasciculata, Nebenniere)}$ ) war in den G Tieren um 40 % gegenüber den C Tieren erhöht und um 23 % in GB gegenüber C. Der Unterschied zwischen G und GB betrug 13 % (Abbildung 36).



**Abbildung 36: Absolute Zahl ( $N_{(Zona\ fasciculata, Nebenniere)}$ ) der Zona fasciculata Zellen der Nebennieren. Das linke Diagramm (A) zeigt die Zellzahl in den 38 Tage alten Tieren, das rechte Diagramm (B) zeigt die Zellzahl in den 11 Wochen alten Tieren. Der Unterschied in der Zellzahl zwischen den beiden Gruppen wird deutlich. In beiden Altersgruppen war die Zellzahl in den G und GB Tieren deutlich gegenüber den C Tieren erhöht (mean  $\pm$  SD; N= 3). Rechte Abbildung entnommen aus (Hoefflich et al. 2002).**



**Abbildung 37: Mittleres Volumen der Zona fasciculata Zellen (v). Das linke Diagramm (A) zeigt die mittlere Zellgröße in den 38 Tage alten Tieren, das rechte Diagramm (B) zeigt die mittlere Zellgröße in den 11 Wochen alten Tieren. Der Unterschied in der Zellgröße zwischen beiden Altersgruppen wird deutlich. In den 38 Tage alten Tieren ist die Zellgröße etwa dreimal so groß, wie in den 11 Wochen alten Tieren. In den 38 Tage alten Tieren Altersgruppen war die Zellgröße in den G und GB Tieren deutlich gegenüber den C Tieren erhöht (mean  $\pm$  SD; N= 3), in den 11 Wochen alten Tieren war das mittlere Zellvolumen nur in den G Tieren deutlich erhöht. Rechte Abbildung entnommen aus (Hoefflich et al. 2002).**

Das mittlere Volumen der Zona fasciculata Zellen (v) war in G Tieren um 12 % gegenüber den C Zellen erhöht und in den GB Tieren um 10 %. In den G und GB Tieren war v nahezu identisch. In den 38 Tage alten Tieren erreichten weder die Unterschiede in der Zellzahl, noch in der Zellgröße statistische Signifikanz.



## **5 Diskussion**

Die Kontrolle des Wachstums wurde bereits in unterschiedlichen Systemen und verschiedenen Modellen untersucht (Conlon & Raff 1999). Die Basis für unsere Untersuchungen bildete ein Modell, in dem die Zellgröße unabhängig von der Zellzahl reguliert war. IGFBP-2 ist im GH Überexpressionsmodell in der Lage selektiv die Zellgröße in den Zona fasciculata Zellen der Nebenniere in G versus GB Tieren zu reduzieren, die ebenfalls vorhandene Hypertrophie bleibt unbeeinflusst (Hoeflich et al. 2002).

Um möglichst umfassend nach Faktoren für die Zellgrößenregulation in unserem Modell zu suchen, für das heterozygote IGFBP-2-transgene Mäuse mit heterozygoten GH-transgenen Mäusen verpaart wurden, wurden verschiedene Untersuchungsmethoden herangezogen. Zunächst sollte eine Untersuchung des Transkriptoms möglichst umfassend Veränderungen der Genaktivität erfassen. Die Untersuchung etablierter Signalkaskaden wurde durchgeführt, um zielgerichtet bekannte Regulationsmechanismen für die Kontrolle von Zellgröße und Zellzahl zu untersuchen. Darüberhinaus wurde die Charakterisierung des Modells auf eine weitere Altersgruppe (38 Tage) erweitert, um die Wachstumsanalyse in der Nebenniere zu vertiefen.

### **5.1 Transkriptomanalyse**

#### **5.1.1 Hintergrund**

Jede Zelle eines Organismus enthält in der Regel denselben Chromosomensatz und damit dieselbe Erbinformation. In den verschiedenen Geweben und Zelltypen wird nur ein relativ kleiner Teil der genetischen Information für die Synthese von Proteinen benötigt. Die dazu notwendigen mRNAs können dann isoliert und analysiert werden. Alle zu einem definierten Zeitpunkt in einer Zelle vorhandenen mRNA-Spezies werden als Transkriptom bezeichnet. Durch einen Vergleich der Häufigkeit der mRNA-Muster in unterschiedlichen Zellen können solche mRNA-Spezies identifiziert werden, deren Konzentration unterschiedlich hoch ist und die deshalb als differentiell exprimierte Gene bezeichnet werden. Da die Expression von Genen auch den Aufbau und die Größe von Organen und Organismen bestimmt, können solche Gene, die beispielsweise das Zellwachstum steuern, durch eine Analyse der differentiellen Genexpression erfasst werden. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht

werden, ob durch eine Kombination aus sogenannten subtraktiven cDNA-Bibliotheken und cDNA-Array-Hybridisierung Unterschiede in der Genexpression in verschiedenen großen Nebennieren nachgewiesen werden können. Dieser experimentelle Ansatz wurde bereits bei mehreren biologischen Modellsystemen erfolgreich angewendet (Bauersachs et al. 2003; Bauersachs et al. 2004; Bauersachs et al. 2005; Diehl et al. 2005).

### **5.1.2 Zusammenfassung der Ergebnisse**

In der vorliegenden Arbeit konnten neben IGFBP-2 zwei Gene identifiziert werden, welche bei der cDNA-Array-Hybridisierung ein signifikant höheres Signal bei den doppeltransgenen Tieren aufwiesen. Bei Prp4 handelt es sich um einen Bestandteil des Spleißosoms, der eine Serin/Threonin Kinase Aktivität und auch Strukturhomologien zu MAPK besitzt. Dem zweiten Gen, Pex11c, konnte bisher noch keine Funktion zugeordnet werden. Es erhielt seinen Namen Peroxisomal Biogenensis Faktor 11c durch eine Strukturverwandtschaft mit anderen Mitgliedern der Peroxisomen-Biogenese Faktoren Familie.

### **5.1.3 Validierung mittels quantitativer PCR**

Die differentielle Expression der beiden in der Array-Hybridisierung gefundenen Gene sollte durch eine qPCR bestätigt werden. Die qPCR wurde als Validierungstechnik gewählt, da sie sehr sensitiv ist (Bangur et al. 2002), eine relativ genaue quantitative Bestimmung ermöglicht und nur sehr wenig RNA als Ausgangsmaterial benötigt (Rajeevan et al. 2001). Prp4 und Pex11c konnten durch die qPCR nicht als differentiell exprimiert bestätigt werden. Dafür gibt es mehrere mögliche Ursachen: die cDNA, die in der qPCR eingesetzt wurde, stammte nicht aus den Nebennieren der Tiere, die für die Herstellung der subtraktiven cDNA-Bibliotheken und die cDNA-Array-Hybridisierung verwendet worden waren. Auch wurden nur 3 beziehungsweise 2 Tiere pro Genotyp untersucht.

Dieses widersprüchliche Ergebnis konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden, da kein weiteres Nebennierenmaterial für zusätzliche Untersuchungen zur Verfügung stand. Für Prp4 steht ein Antiserum zur Verfügung, welches für die Überprüfung auf Proteinebene verwendet werden kann. Für Pex11c muss ein Antiserum erst hergestellt werden.

### 5.1.4 Identifizierte Gene

#### 5.1.4.1 Pre mRNA processing factor (Prp4)

Eines der differentiell exprimiert identifizierten Gene ist Prp4. Bei Prp4 handelt es sich um den pre mRNA processing Faktor 4. Der Name stammt von seiner Funktion bei der Prozessierung der mRNA. Tatsächlich ist Prp4 ein Bestandteil des Spleißosoms, einem Komplex aus fünf kleinen nukleären RNAs (snRNA) und etwa 50 Proteinen (Horowitz et al. 2002). Spleissen ist eine posttranskriptionelle Veränderung der mRNA, wobei die Introns der Prä-mRNA entfernt werden. Humanes Prp4 zählt zu den Cyklin-dependent ähnlichen Kinasen (Cdk) (Huang et al. 2000) und besitzt als einziger bisher bekannter Bestandteil des Spleißosoms eine Serin/Threonin Kinase Aktivität und eine starke Homologie zur katalytischen Domäne der Familie der MAPKs, die in vielen Signalwegen eine Rolle spielen (Huang et al. 2000). Eine der vermuteten Funktionen dieser Kinase ist die Phosphorylierung anderer Bestandteile des Spleißosoms und einer damit verbundenen Aktivierung (Miyata & Nishida 1999). Die Ähnlichkeiten von Prp4 in der Hefe und in höheren Organismen sind sehr hoch, was auf eine konservierte Funktion und die Bedeutung von Prp4 hinweist. In der Hefe gibt es Hinweise durch Mutationsversuche, dass Prp4 beim Wachstum eine Rolle spielen könnte (Alahari et al. 1993). Allerdings ist nicht klar, ob diese Funktion in Verbindung mit dem Spleissen steht oder ob sie unabhängig davon ist. Eine Arbeitsgruppe konnte in Eukaryonten einen Zusammenhang zwischen der wachstumsrelevanten Signaltransduktion und Prp4 nachweisen (Huang et al. 2000). Durch seine Kinasefunktion ist Prp4 in der Lage, Elk-1 zu phosphorylieren. Bei Elk-1 handelt es sich um ein Substrat, das durch alle bekannten MAPK Signalwege an der C-terminalen Domäne phosphoryliert werden kann. In den letzten Jahren wurde die Funktion von Prp4 in der Signalübertragung unabhängig vom Spleissen nicht weiterverfolgt. Unsere Ergebnisse im Zusammenhang mit der Zellgrößenregulation in Zona fasciculata Zellen der Nebenniere weisen aber darauf hin, dass es interessante Zusammenhänge zwischen Prp4 und der Zellgrößenregulation geben könnte.

#### 5.1.4.2 Peroxisomal Biogenesis Faktor 11c (Pex11c)

Pex11c erhielt seinen Namen Peroxisomal Biogenesis Faktor 11c durch eine Strukturverwandtschaft mit anderen Mitgliedern der Peroxisomen-Biogenese-Faktoren-Familie. Welche Funktion Pex11c spielt und ob es möglicherweise an der Regulation des Zellwachstum beteiligt sein könnte, ist bisher noch nicht geklärt.

Das Gelanalysebild nach der Kolonie-PCR zeigt zwei Banden übereinander und auch in der anschließenden Sequenzierung kann man zwei übereinanderliegende Sequenzen erkennen. Das bedeutet, dass es sich bei dem als Pex11c identifizierten Gen, um einen sogenannten Doppelklon handelt. Das heißt, es wurden vermutlich zwei cDNA Fragmente nach der subtraktiven Hybridisierung in den Vektor kloniert. Da nur das längere Fragment als Teil von Pex11c identifiziert werden konnte, besteht die Möglichkeit, dass die Unterschiede auf dem Array nicht durch Pex11c verursacht werden, sondern durch das kürzere cDNA-Fragment. Dieses konnte allerdings bei der Sequenzierung wegen der Überlagerung der beiden Sequenzen nicht identifiziert werden.

### **5.1.5 Interpretation der Ergebnisse**

Die Ergebnisse werfen die Frage auf, weshalb außer IGFBP-2 keine weiteren differentiell exprimierten Gene eindeutig identifiziert werden konnten. Für die Transkriptom-Untersuchungen wurden pro Gruppe (G bzw. GB) Proben von jeweils 5 – 6 Tieren analysiert. Zudem wurde jede Hybridisierung zweimal durchgeführt. Aus diesen Gründen und aufgrund der hohen Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der verwendeten Methode ist anzunehmen, dass keine technischen Ursachen für diesen Befund vorliegen. Die Gründe sind wahrscheinlich eher im verwendeten biologischen System und im untersuchten Phänomen, der Steuerung von Zellgröße, zu suchen.

Die cDNA-Bibliotheken wurden für GH-transgene (G) und doppeltransgene (GB) Tiere angelegt. Beide Tiergruppen zeichnen sich durch eine ständige Expression von GH bzw. IGFBP-2 aus, da ein ubiquitär exprimierender Promotor, ohne zeitliche Begrenzung, verwendet wurde. Diese ständige Expression von GH und IGFBP-2 kann bereits peripartal bzw. während der Embryonalentwicklung Effekte auf den Proteingehalt der Zelle ausüben und möglicherweise eine spätere Veränderung in der Transkriptionsmenge nicht mehr erforderlich machen. Unsere Ergebnisse auf Transkriptomebene lassen die Möglichkeit offen, dass die Wachstumsregulation in unserem Modell auf Proteinebene stattfindet. Es ist bekannt, dass posttranslatorische Prozesse (Phosphorylierung) auf Transkriptionsebene nicht nachweisbar sind. Gerade die Regulation der intrazellulären Signalkaskaden erfolgt nicht über Unterschiede in der Proteinmenge, sondern in der Regel über unterschiedliche Phosphorylierungszustände. Bei der Bierhefe konnte außerdem nachgewiesen werden, dass der Proteingehalt einer Zelle nicht immer direkt mit dem mRNA Gehalt korreliert ist (Gygi et al. 1999).

Eine Ursache dafür, dass keine eindeutig differentiell exprimierte Gene gefunden wurden, könnte auch sein, dass Unterschiede in der Zellgröße nur in der Zona fasciculata festgestellt wurden, die nur etwa 40 % des untersuchten Gewebes ausmacht. Die RNA für die Untersuchungen werden aber aus der gesamten Nebenniere gewonnen, da eine Unterscheidung und Trennung am nativen Organ nicht möglich ist. Unter der Annahme, dass z.B. eine mRNA im Vergleich von G zu GB in der Zona fasciculata sich um den Faktor 4 in der Konzentration ändert, wäre sie bei ansonsten gleich hoher Expression durch die Subtraktion kaum anreicherbar und der Unterschied schwer durch Array-Hybridisierung nachweisbar, da er insgesamt nur bei maximal Faktor 2,2 liegt. Das heißt, durch die „Verdünnung“ des eigentlichen Zielgewebes sind geringere Unterschiede technisch nicht oder nur sehr schwer nachweisbar.

In der Literatur lassen sich keine Versuchsansätze finden, die mit unserem methodisch vergleichbar wären. Meist wurden induzierbare Promoter verwendet oder Behandlungen mit chemischen Reagenzien durchgeführt (Dickey et al. 2003). Auf diese Weise werden erst direkt vor dem Untersuchungszeitpunkt Gene angeregt, da sie auf die veränderten Umwelteinflüsse reagieren müssen. Der größte Teil der Studien, sowohl in der Zellkultur als auch im transgenen Tier, beschäftigt sich mit der Untersuchung von tumorösem im Vergleich zu nicht tumorösem Gewebe (Politi et al. 2004). Allerdings handelt es sich bei einer Tumorzelle um eine stark veränderte Zelle, die oft schon morphologisch kaum noch Ähnlichkeiten mit ihrem Ausgangsgewebe aufweist. Auch in ihren Eigenschaften, wie Proliferation, Migration und Metastasierung unterscheidet sie sich von ihrem Ursprungsgewebe. In unserer Studie wurden dagegen Nebennieren verwendet, deren Zellen sich zwar in der Größe unterscheiden, aber morphologisch und auch funktionell identisch sind. Der einzige funktionale Unterschied zwischen den großen und kleinen Zellen ist eine Veränderung der Kortikosteroidproduktion, die aber im selben Verhältnis auftritt wie die Zellhypertrophie. In diesem Zusammenhang würde sich eine Untersuchung der für die Hormonproduktion verantwortlichen Proteine anbieten, um zu klären, ob eine erhöhte Anzahl an Proteinen im Bezug auf das Gesamtprotein einer Zelle vorliegt, die im Zusammenhang mit der Hormonproduktion stehen. Bisher wurde auch in keiner Studie gezeigt, dass die Steuerung der Zellgröße in Zellen höherer Eukaryonten durch veränderte mRNA Spiegel erfolgt.

### **5.1.6 Ausblick**

Diese Ergebnisse bieten trotzdem eine ganze Reihe von Ansatzpunkten für weitere Untersuchungen. Ein neuer Ansatz, um die Fragen nach Zellgrößen- und Zellzahlregulation

auf Ebene des Transkriptoms zu klären, könnte die Verwendung eines induzierbaren Transgens sein, um direkt nach der Aktivierung von IGFBP-2 die Veränderungen zu untersuchen.

Eine zusätzliche Untersuchung von Prp4 auf der Ebene des Proteins mit Hilfe eines Westernimmunoblots könnte Aufschluss darüber geben, ob es in der IGFBP-2-induzierten Zellgrößenregulation eine Rolle spielt.

## **5.2 Veränderungen in bekannten Signalkaskaden**

### **5.2.1 Hintergrund**

Veränderungen an der Zelle können auf der Ebene des Transkriptoms, aber auch auf der Ebene des Proteoms untersucht werden. Die Untersuchung des gesamten Proteoms einer Zelle ist mit einem sehr großen Material- und Zeitaufwand verbunden. Vor einer umfassenden und systematischen Proteomanalyse sollten zunächst Kandidaten untersucht werden, von denen bekannt ist, dass sie an der Zellzahl- und Zellgrößenregulation beteiligt sind.

Der Phosphoinositol 3-Kinase (PI3K) Signalweg hat sich in den letzten Jahren als einer der Hauptwege herausgestellt, über den Zellen ihre Größe regulieren. Sowohl IGF-I als auch GH sind in der Lage den PI3K-Weg zu kontrollieren (Kozma & Thomas 2002; Moutoussamy et al. 1998). Die systematische Analyse von einzelnen Komponenten (PI3K, Akt, S6K, GSK3, mTOR) dieses Signalweges führten sowohl an transgenen Tieren als auch in Zellkultursystemen zu Veränderungen von Zellzahl oder Zellgröße oder zu beidem. Die Überexpression von PI3K in Herzmuskelzellen bei Mäusen führte zu einer Vergrößerung des Herzens und eine Reduktion von PI3K in den Herzmuskelzellen zu einem kleineren Herz. Der Effekt war bedingt durch eine Veränderung der Zellgröße (Shioi et al. 2000). Eine Überexpression von dem Drosophila Homolog für PI3K führte zu vergrößerten Zellen in der Keimscheibe und auch zu vergrößerten Organen in der adulten Fliege, wohingegen Mutationen von PI3K zu einer Reduktion der Organgröße führten. In Drosophila wurden die Größenveränderungen sowohl durch eine Veränderung der Zellzahl als auch der Zellgröße ausgelöst (Weinkove et al. 1999). Organspezifische Deletionen von Akt im Auge und im Flügel von Drosophila führten zu einer Zellgrößenabnahme (Verdu et al. 1999). Transgene Mäuse, die Akt spezifisch im Herz überexprimieren, entwickeln eine Herzhypertrophie, die vor allem durch eine Größenzunahme der Myozyten bedingt ist (Shioi et al. 2002). Die Ausschaltung des S6K Gens in Mäusen führt zu einer Reduktion der Körpergröße (Shima et al. 1998). Homozygote Drosophila Mutanten sind 50 % kleiner und eine Untersuchung der

Zellen ergab, dass lediglich die Zellgröße reduziert war, aber nicht die Zahl der Zellen (Montagne et al. 1999). Die Inhibition von GSK3 in der Zellkultur von Myozyten führt zu einer Zellhypertrophie, was darauf hinweist, dass auch GSK3, ein Effektor im PI3K-Weg sein kann (Vyas et al. 2002). Zelltypspezifische Mutationen von dTOR führen zu verkleinerten Zellen sowohl im Auge als auch in den Flügeln (Oldham et al. 2000)

Weil eine ganze Reihe von Komponenten des PI3K-Weges in unterschiedlichen Modellen einen spezifischen Effekt auf die Zellgrößenregulation hatte, wurde das Hauptaugenmerk unserer Untersuchung auf den PI3K-Weg gelegt.

## **5.2.2 Interpretation der Ergebnisse**

### **5.2.2.1 Analyse der Signaltransduktion im Alter von 11 Wochen**

PDK1 gilt als eine zentrale Komponente im PI3K-Weg (Toker & Newton 2000), denn es ist in der Lage durch seine Kinasefunktion weitere Substrate, wie Akt und S6Kinase, des PI3K-Weges zu aktivieren. PDK-hypomorphe Mäuse zeigen, wie auch IGFBP-2 transgene Tiere, eine Reduktion des Körpergewichts (Lawlor et al. 2002). In *Drosophila melanogaster* sind homozygote PDK  $-/-$  Fliegen, genauso wie Mäuse, nicht überlebensfähig (Cho et al. 2001). Bereits so einfache Organismen wie Hefen sind auf PDK1 für ihre Entwicklung angewiesen (Casamayor et al. 1999) und auch in *Caenorhabditis elegans* ist PDK essentiell für eine Weiterentwicklung nach dem Larvenstadium (Paradis et al. 1999). Interessanterweise konnten wir in unseren Versuchen tatsächlich eine Absenkung der Aktivierung von PDK1 in den GB versus G Tieren nachweisen.

Auch Lawlor (2002) hatte in den hypomorphen PDK1  $+/-$  Mäusen eine morphometrische Untersuchung der Zona fasciculata Zellen in der Nebenniere durchgeführt. Dabei konnte er eine Abnahme der Zellgröße ohne Veränderung der Zellzahl im Vergleich mit den Wildtyp Geschwistern sehen. Damit spiegeln die PDK  $+/-$  Mäuse den Phänotyp aus unserem Modell aus dem Vergleich der G mit den GB Tieren wider. Wir betrachten das als eindeutigen Hinweis, dass die Absenkung der Aktivierung von PDK1 tatsächlich für die Verminderung der Zellgröße in den GB Tieren verantwortlich ist. Durch unsere Ergebnisse erhalten die Untersuchungen von Lawlor (2002) eine biologische Relevanz, weil eine Reduktion von Zellgrößen einerseits durch die Manipulation von PDK1 verursacht werden kann. Andererseits konnte beobachtet werden, dass bei Veränderungen der Zellgröße Änderungen der Aktivitäten von PDK1 auch tatsächlich nachgewiesen werden können. Auch für IGFBP-2 als negativer Regulator des Wachstums konnte der Beweis einerseits über das transgene

Tiermodell (Hoeflich et al. 1999) und andererseits über den Nachweis erhöhter IGFBP-2 Spiegel im Serum von Mäusen, die auf niedriges Körpergewicht gezüchtet worden waren (Hoeflich et al. 1998), geführt werden.

In der Arbeit von Lawlor et al (2002) ist PDK1 gezielt blockiert worden. Für uns stellte sich jetzt die Frage, wodurch die Verminderung der Aktivierung in den GB Mäusen ausgelöst wurde. Als negativer Regulator von PDK1 im PI3K-Weg gilt PTEN (Goberdhan & Wilson 2003a). Durch seine Lipidphosphatasefunktion wandelt PTEN PIP<sub>3</sub>, das Substrat von PI3K wieder in PIP<sub>2</sub> um und wirkt so als Antagonist im PI3K-Weg. PIP<sub>3</sub> ist für die Aktivierung von PDK1 verantwortlich (Goberdhan & Wilson 2003a). Veränderungen an PTEN führen sowohl zu einer Veränderung der Zellzahl als auch der Zellgröße in Drosophila (Goberdhan et al. 1999). Eine Untersuchung von PTEN ist nicht an homozygoten Tieren möglich, da sowohl Tiere, die PTEN überexprimieren, als auch Tiere, die PTEN Mutationen tragen, nicht lebensfähig sind. Daher wurden die Funktionen von PTEN bei Drosophila durch gezielte Veränderungen an den Augen und am Flügel untersucht (Xu & Rubin 1993) und bei Mäusen unter anderem in einem Modellsystem mit einer gezielten Reduktion von PTEN nur im Gehirn (Groszer et al. 2001). Die Ausschaltung von PTEN im Gehirn führte zu einer deutlichen Vergrößerung des Organs bedingt durch eine Zunahme der Zellgröße und eine gesteigerte Zellzahl. Wir wollten überprüfen, ob PTEN in unserem Modell für die Regulation der PDK1 Aktivität verantwortlich ist, und damit auch für die IGFBP-2 induzierte Zellgrößenregulation. Bei der Untersuchung konnte tatsächlich eine Aktivierungszunahme von PTEN in den GB Tieren gegenüber den G Tieren festgestellt werden. Bei PTEN handelt es sich um einen bedeutenden Tumorsuppressor, der in vielen tumorösen Prozessen verändert ist (Kishimoto et al. 2003). PTEN greift in den PI3K-Weg ein, aber es ist nicht bekannt, wie PTEN reguliert wird. Die PIPs sind an der Zellmembran lokalisiert, PTEN findet man jedoch vor allem im Zellkern (Perren et al. 2000). In tumorös veränderten Zellen findet man PTEN häufig in verstärktem Maße im Zytoplasma im Vergleich zu normalen Zellen des selben Zelltyps (Gimm et al. 2000; Perren et al. 2000), was die Vermutung nahelegt, dass PTEN durch die Lokalisation innerhalb der Zelle reguliert wird. In glatten Muskelzellen gibt es Hinweise, dass PTEN durch das Heparan-Sulfat-Proteoglykan Perlecan reguliert wird, allerdings ist noch völlig unklar, durch welchen Mechanismus das zustandekommen könnte. Außer einem direkten Effekt von der Perlecan Aktivität auf die Aktivität von PTEN konnte in glatten Muskelzellen ein direkter Effekt von PTEN auf die Aktivitätsverminderung von FAK nachgewiesen werden (Garl et al. 2004). PTEN besitzt sowohl eine Lipid- als auch eine Proteinphosphatase Aktivität (Myers et al. 1997). Die am besten beschriebene Funktion von



PTEN, die Umwandlung von PIP<sub>3</sub> in PIP<sub>2</sub>, kommt durch die Fähigkeit von PTEN, Lipide zu phosphorylieren, zustande (Maehama & Dixon 1998). Durch *in vitro* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass PTEN auch zur Dephosphorylierung von fokaler Adhäsionskinase (FAK) in der Lage ist. Diese Funktion wurde der Phosphataseaktivität zugeschrieben (Tamura et al. 1998; Tamura et al. 1999), allerdings wird FAK in PTEN <sup>-/-</sup> Stammzellen auf dem selben Niveau aktiviert wie in unveränderten Zellen. Dadurch bleibt die Funktion der Proteinphosphatase von PTEN unklar. Allerdings bedeutet das nicht, dass die Dephosphorylierung von FAK keine Rolle *in vivo* spielt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Regulation in verschiedenen Signalwegen immer in Bezug auf das Alter betrachtet werden muss. Da *in vivo* die Regulation von FAK nicht in älteren Individuen untersucht werden kann, muss die Frage nach der Rolle der FAK Dephosphorylierung zunächst unbeantwortet bleiben. Auf dem letzten GH-IGF Symposium wies eine Gruppe auf Zusammenhänge zwischen der Regulation von IGFBP-2 und PTEN hin (Chen et al. 2004). Sie konnten in Arrayanalysen im Zusammenhang mit Mutationen von PTEN einen Anstieg von IGFBP-2 beobachten und dieses Phänomen auch im Westernimmunoblot und in immunhistochemischen Analysen bestätigen. Auf diese Weise kann ein Zusammenhang zwischen PTEN, IGFBP-2 und FAK hergestellt werden, denn es ist bekannt, dass IGFBP-2 durch seine RGD-Domäne an Integrine binden kann (Schutt et al. 2004). Diese Bindung wiederum führt zu einer Aktivierung von FAK. Möglicherweise führt dieser Mechanismus zu einer Steigerung der PTEN Aktivität und stellt damit das Verbindungsglied zwischen IGFBP-2 abhängiger Zellgrößenregulation durch eine Regulation der PDK1 Aktivität dar. PTEN kann auch im ras/MAPK Signalweg einen wachstumsvermindernden Effekt ausüben (Weng et al. 2002). Diesen Effekt übt es zumindest in der Zellkultur unabhängig davon aus, ob MAPK durch Integrine oder Wachstumsfaktoren aktiviert wurde (Gu et al. 1998). Neben der Frage, wie PTEN reguliert wird, interessiert natürlich besonders die Frage, wie PDK1 seine Informationen weitergibt und wie es letztlich zur Regulation auf Zellgrößenebene kommt. Deshalb wurden mehrere bekannte Effektorproteine unterhalb von PDK1 untersucht. Akt das Hauptsubstrat von PDK1 wurde als erstes überprüft (Shioi et al. 2002; Toker & Newton 2000). Es konnte keine Veränderung von Akt (Thr 308) im Westernimmunoblot im Vergleich zwischen den G und GB Tieren festgestellt werden. Wir überprüften zusätzlich noch weitere „downstream“ gelegene Komponenten des PI3K-Weges. Erwartungsgemäß konnten wir weder für GSK3 noch für mTOR (Fingar et al. 2002; Jope & Johnson 2004) eine Aktivitätsänderung im Vergleich zwischen G und GB Tieren feststellen, was unseren Befund, dass Akt (Thr 308) nicht aktiviert wird, bestätigt. Auch hier stimmen unsere Befunde mit denen von Lawlor (2002) überein.

Diese Arbeitsgruppe konnte ebenfalls keine Veränderungen in bekannten Substraten von PDK1 nachweisen.

#### 5.2.2.2 Analyse der Signaltransduktion im Alter von 38 Tagen

Bereits im Alter von 38 Tagen konnte ein deutlicher Effekt von IGFBP-2 auf das GH-abhängige Wachstum festgestellt werden (Hoeftlich et al. 2002). Um IGFBP-2 abhängige Effekte auf das Nebennierenwachstum zu überprüfen, wurden PTEN und PDK1 zusätzlich in diesem Alter untersucht. Interessanterweise konnte kein Unterschied in der Aktivierung von PDK1 und PTEN zwischen den G und GB Tieren gefunden werden. Es stellte sich daher die Frage, ob die Effekte auf zellulärer Ebene ebenfalls fehlten. Aus diesem Grund wurden auch in 38 Tage alten Tieren morphometrische Untersuchungen analog zu den Untersuchungen in den 11 Wochen alten Tieren durchgeführt (siehe 5.3.2). Dabei wurden keine Veränderungen der Zellgröße zwischen den G und GB Tieren festgestellt. Damit wurde erneut eine Verbindung zwischen PTEN/PDK1 und der Zellgrößenregulation bestätigt. Offensichtlich setzt die Zellgrößenregulation von PTEN und PDK1 durch IGFBP-2 erst zu einem späteren Zeitpunkt ein. Es ist bislang noch vollkommen unklar, wodurch die zeitlich differentiellen Effekte von IGFBP-2 bedingt sind. Aber es ist deutlich geworden, dass selbst Effekte in transgenen Organismen, die das Transgen permanent exprimieren, in Bezug auf das Alter interpretiert werden müssen.

#### 5.2.3 Suche nach weiteren Verbindungsgliedern

Insgesamt haben wir mit unseren Ergebnissen einen eindeutigen Hinweis auf einen möglichen Mechanismus bekommen, wodurch die IGFBP-2 induzierte Zellgrößenabnahme in den GB Tieren entsteht. Allerdings bleibt die Frage, über welche Verknüpfungen PDK1 in unserem Modell seine Informationen weitergibt. Und es bleibt auch unklar, welche Mechanismen PTEN regulieren. Denn bisher konnten weder von uns noch von anderen Gruppen relevante Substrate identifiziert werden. Es müssen entweder noch völlig unbekannte Faktoren vorhanden sein, oder Verknüpfungen zu bekannten Substraten, die bisher noch nicht in diesem Zusammenhang betrachtet wurden.

Durch eine Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass PDK1 zu einer Aktivierung von Ral-GEFs (Ral guanine nucleotide exchange factors) führt (Tian et al. 2002). Diese Faktoren gehören, zusammen mit Raf Kinasen und PI3K zu einer Gruppe von Proteinen, die durch Ras aktiviert werden. Ras wird durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) aktiviert, zu denen auch der IGFIR gehört. Die Funktion der Ral-GEFs ist die Umwandlung von Ral-GDP in Ral-GTP,

indem sie die Ablösung von GDP und dadurch eine Bindung von GTP ermöglichen. PDK1 ist in der Lage, ihre Aktivität zu verstärken. Zur Verstärkung der Ral-GEF Aktivität durch PDK1 kommt es nicht über die PDK1-Kinasefunktion wie in den bisher bekannten Substraten aus dem PI3K-Weg. In getrennten Versuchen wurde gezielt die SH Domäne im C-terminalen Bereich von PDK1 verändert, dann der Bereich, der für die Funktion als Kinase verantwortlich ist und sich im Zentrum des Proteins befindet, und zuletzt der N-terminale Bereich. Die Aktivität der Ral-GEFs konnte nur in den Versuchen mit dem mutierten N-terminalen Bereich nicht gesteigert werden. Bisher konnten die Funktionen von PDK1 nur auf seine Kinaseaktivität zurückgeführt werden (Toker & Newton 2000). Die Feststellung, dass PDK1 auch kinaseunabhängig Signale weitergeben kann, führt zu ganz neuen Untersuchungsansätzen. Die Untersuchung der Aktivierung von Ral-GEFs in unserem Modell könnte neue Erkenntnisse in der Signalübertragung durch PDK1 bringen.

Auch die Untersuchung von Prp4 auf der Proteinebene könnte neue Erkenntnisse bringen. In Hefen ist ja bereits bekannt, dass es einen Zusammenhang zwischen Prp4 und der Wachstumsregulation gibt (Alahari et al. 1993). Eine Arbeitsgruppe konnte auch in Eukaryonten einen Zusammenhang zwischen wachstumsrelevanter intrazellulärer Signaltransduktion und Prp4 nachweisen. Prp4 besitzt Strukturen, die für das katalytische Zentrum von MAPK typisch sind. MAPK teilt man in drei Gruppen ein, die alle auf Signalwegen unterhalb von RTKs in Erscheinung treten. Elk-1 kann durch alle bekannten MAPK Signalwege an der C-terminalen Domäne phosphoryliert werden. Huang et al (2000) konnten nachweisen, dass auch Prp4 zur Phosphorylierung von Elk-1 in der Lage ist. Obwohl die Phosphorylierungsstelle von Prp4 ebenfalls am C-terminalen Ende von Elk-1 liegt, unterscheidet sie sich von der anderer MAPK. Die unterschiedlichen Konsequenzen konnten noch nicht geklärt werden. Man kann also davon ausgehen, dass Prp4 eine Rolle sowohl in der Signalübertragung als auch in mRNA-Spleiss-Prozessen spielt. In den letzten Jahren wurde die Funktion von Prp4 in der Signalübertragung nicht weiterverfolgt, aber unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass interessante Zusammenhänge zwischen Prp4 und der Regulation des Zellgrößenwachstums in der Nebenniere bestehen könnten.

#### **5.2.4 Ausblick**

In unserem Modell sind Zellzahl- und Zellgröße wahrscheinlich durch zwei unterschiedliche Signalwege reguliert, wovon im Alter von 11 Wochen offenbar nur der Signalweg, welcher die Zellgröße reguliert, durch IGFBP-2 antagonisierbar ist.

Man kann davon ausgehen, dass in unserem Modell GH bei der Induzierung von Zellhypertrophie und -hyperplasie direkt oder indirekt beteiligt ist. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es Faktoren zu identifizieren, die speziell in unserem Modell für die Abnahme der Zellgröße von G zu GB Tieren verantwortlich sind. Der Einfluss von GH auf die Regulation von Zellzahl und Zellgröße in den Zona fasciculata Zellen der Nebenniere ist Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten an unserem Institut. In diesem Zusammenhang sollen auch weitere Verknüpfungen zwischen der GHR Signaltransduktion und der IGFIR Signaltransduktion überprüft werden. Gegenwärtig wird auch ein Effekt von IGFBP-2 auf die integrinabhängige Signaltransduktion untersucht.

### **5.3 Morphometrie**

#### **5.3.1 Hintergrund**

Mit dem Begriff Stereologie wird die Gesamtheit der Verfahren zusammengefaßt, die dazu dienen, aus zweidimensionalen Abbildungen von dreidimensionalen Objekten Informationen über deren räumliche Struktur zu erhalten. In der vorliegenden Arbeit wurden murine Nebennieren mit Hilfe von quantitativ-stereologischen Untersuchungsverfahren analysiert.

Da bereits die 11 Wochen alten Mäuse quantitativ zu erfassende Unterschiede im Phänotyp zeigten, war es interessant, eine zweite Altersgruppe in die Untersuchung mit aufzunehmen, denn bereits bei den Proteinuntersuchungen sind Unterschiede zwischen den beiden Altersgruppen aufgefallen. In den 11 Wochen alten Tieren konnten Veränderungen in der Aktivität von PTEN und PDK1 nachgewiesen werden. Die Veränderungen wurden in den 38 Tage alten Tieren nicht gesehen. Um die Vermutung der tragenden Rolle von PDK1 bei der Wachstumskontrolle in unserem Modell zu prüfen, wurde die stereologische Charakterisierung auf die 38 Tage alten Tiere erweitert.

#### **5.3.2 Interpretation der Ergebnisse**

Die stereologischen Messungen wurden analog zu jenen durchgeführt, die im Vorfeld an den 11 Wochen alten Tieren durchgeführt wurden (Hoeflich et al. 2002), um vergleichbare Daten zu erhalten. Bei der Bestimmung des Volumenanteils der einzelnen Kompartimente der Nebenniere wurde deutlich, dass eine tendenzielle Ausrichtung im Hinblick auf die Ergebnisse in den 11 Wochen alten Tieren festzustellen war, obwohl die Unterschiede zwischen den genetischen Gruppen noch nicht so deutlich waren. Bestimmt wurden zunächst

die Volumenanteile vom gesamten Mark und der gesamten Rinde. Anschließend wurden die Anteile der einzelnen Rindenschichten bestimmt. Getrennt wurden von außen nach innen die Zona glomerulosa, die Zona fasciculata und die Zone X betrachtet. Eigentlich hatten wir erwartet, keine Zone X mehr zu finden, denn in einem Alter von 5 Wochen sollte diese in männlichen Individuen verschwunden sein (Firth 1983), allerdings konnten wir direkt am Mark vereinzelt Zellen erkennen, die im Zytoplasma eine deutliche Vakuolisierung zeigten. Diese Zellen wurden getrennt erfasst und in der Auswertung als Zone X bezeichnet. Im Einzelnen kann man die Ergebnisse der Volumenbestimmung im Vergleich mit der Arbeit von Hoeflich et. al. (2002) folgendermaßen zusammenfassen: Das Gewicht der Nebennieren lag bei den G Tieren 28 % über dem der C Tiere und bei den GB Tieren 23 % über dem der C Tiere. Bei den 11 Wochen alten Tieren waren es 68 % (G versus C) bzw. 32 % (GB versus C). Das Gesamtvolumen der Nebennierenrinde ( $V_{\text{(Rinde, Nebenniere)}}$ ) war bei den G Tieren 32 % und bei den GB Tieren 29 % größer als bei den C Tieren. Bei den 11 Wochen alten Tieren beliefen sich diese Unterschiede auf 100 % (G versus C) und 70 % (GB versus C). Das Volumen der Zona fasciculata ( $V_{\text{(Zona fasciculata, Nebenniere)}}$ ) war in den G Tieren 56 % und in den GB Tieren 20 % größer, als in den C Tieren. In den 11 Wochen alten Tieren waren diese Werte 115 % (G versus C) und 50 % (GB versus C).

Damit zeichnet sich schon eine tendenzielle Ausrichtung auf die Unterschiede aus den 11 Wochen alten Tieren ab, allerdings sind die Unterschiede noch nicht so deutlich ausgeprägt und auch der Unterschied durch den Einfluss von IGFBP-2 in den GB versus G Tieren ist noch nicht so hoch. Offensichtlich nehmen in der Nebenniere Einflüsse von GH und IGFBP-2 über einen längeren Zeitraum langsam zu.

Als Nebenbefund wurde festgestellt, dass die Zone X in den C Tieren den geringsten Anteil darstellte. Möglicherweise könnte das ein Hinweis auf eine verzögerte Rückbildung in den genetisch veränderten Nebennieren sein. Diesem Befund sollte durch eine gezielte quantitativ-stereologische Analyse der Zone X bei Tieren der verschiedenen Genotypen unter Einbeziehung unterschiedlicher Alterstufen nachgegangen werden.

Unterschiede zwischen den Tieren der beiden Altergruppen ergeben sich auch bei den Relativschätzwerten des Volumens der Zona glomerulosa ( $V_{\text{(Zona glomerulosa/Rinde)}}$ ) und des Volumens der Zona fasciculata ( $V_{\text{(Zona fasciculata/Rinde)}}$ ). In den 11 Wochen alten Mäusen wurde ein Verhältnis von etwa 70 % Zona fasciculata zu etwa 30 % Zona glomerulosa festgestellt. In den 38 Tage alten Tieren wurde ein Verhältnis von etwa 50 % zu 50 % ermittelt. Bei Vergleichen zwischen Mäusen wurde beschrieben, dass der Anteil der Zona fasciculata im Alter abnimmt, was unseren Ergebnissen widersprechen würde, allerdings sind die jungen

Mäuse in dieser Studie bereits im Durchschnitt 69 Tage alt und entsprechen somit unserer alten Gruppe (Sato 1967). Wir können nicht beurteilen, wie sich das Verhältnis der Zona fasciculata zur Zona glomerulosa in unseren Mäusen entwickelt, wenn sie älter werden.

Bei der absoluten Anzahl der Zona fasciculata Zellen ( $N_{\text{(Zona fasciculata, Nebenniere)}}$ ) und dem mittleren Volumen der Zona fasciculata Zellen ( $V_{\text{(Zona fasciculata, Nebenniere)}}$ ) wurden Unterschiede zu den 11 Wochen alten Tieren festgestellt. Die Zellgröße zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den G und GB Tieren, wie es im Alter von 11 Wochen der Fall gewesen war. In beiden Genotypen (G, GB) ist das mittlere Volumen der Zona fasciculata Zellen ( $V_{\text{(Zona fasciculata, Nebenniere)}}$ ) um jeweils 10 % gegenüber den C und B Tieren erhöht. In diesem Alter kann man dafür eine Erhöhung der absoluten Anzahl der Zona fasciculata Zellen ( $N_{\text{(Zona fasciculata, Nebenniere)}}$ ) im Vergleich der G zu den GB Tieren um 13 % erkennen. Die Zellzahl ( $N_{\text{(Zona fasciculata, Nebenniere)}}$ ) in den G Tieren ist gegenüber den C Tieren um 25 % erhöht. Die Unterschiede in Zellzahl und Zellgröße zwischen den Genotypen erreichen jedoch keine statistische Signifikanz, was vor allem auf eine hohe Variabilität zwischen den einzelnen Tieren der jeweiligen genetischen Gruppen zurückzuführen ist. Offensichtlich zeigen junge Tiere noch deutlichere Varianzen in Bezug auf das Größenwachstum als ältere. Die Erkenntnis, dass die Zellgröße in den 38 Tage alten Tieren zwischen den beiden GH tragenden Genotypen noch nicht unterschiedlich reguliert ist, stimmt mit dem Befund der Proteinebene überein, der keine Änderung der Aktivierung von PDK und PTEN ergab.

Die deutlichere Ausprägung der GH und IGFBP-2 Wirkung in den 11 Wochen alten Tieren ist unabhängig von einer Zunahme des Nebennierengewichts, denn das Nebennierengewicht unterscheidet sich kaum zwischen den 38 Tage und 11 Wochen alten Mäusen (dargestellt in (Hoeflich et al. 2002)). Bereits 1968 wurde bei einer Untersuchung an der Nebenniere der Maus festgestellt, dass sich das Nebennierenwachstum in eine schnelle Phase und eine langsame Phase aufteilt. Das Ende der schnellen Phase ist in unterschiedlichen Zuchtstämmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten zwischen 4 und 8 Wochen erreicht, jedoch geht es bei allen mit dem Verschwinden der Zone X einher (Badr et al. 1968). Mit unserem Untersuchungszeitpunkt von 38 Tagen befinden wir uns am Ende der Auflösung der Zone X, wonach dann nach den Erkenntnissen von Bard et al. (1968) auch keine wesentliche Gewichtszunahme bis zu den 11 Wochen alten Tieren mehr stattfinden sollte.

Bemerkenswerterweise wurde bei einem Vergleich der absoluten Zellvolumina zwischen den beiden Altersgruppen festgestellt, dass in den jüngeren Mäusen die Zellgröße um etwa den Faktor 3, unabhängig vom Genotyp, erhöht ist. Dafür beträgt die Zellzahl nur etwa die Hälfte (Abbildung 34; Abbildung 35). Die absolute Masse der gesamten Nebenniere unterscheidet

sich jedoch, wie bereits erwähnt, in beiden Altersgruppen nicht wesentlich. Daraus kann man schließen, dass in der Nebenniere einer jungen Maus Wachstum vor allem über eine Zunahme der Zellgröße zustande kommt und erst später Zellteilungsvorgänge einsetzen, die ohne eine weitere Massenzunahme der Zelle stattfinden. Untersuchungen am Mäuseherz zeigen, dass dort durch einen umgekehrten Mechanismus Wachstum stattfindet. In eben geborenen Mäusen kann man eine Zunahme des Herzgewichts feststellen, obwohl sich das Volumen der Herzmuskelzellen nicht verändert, also finden offensichtlich zunächst Zellteilungen statt. Ab dem vierten Tag nach der Geburt setzt dann eine Hypertrophie der Zellen ein, bis sie im Alter von drei Monaten die Größe von Herzmuskelzellen adulter Mäuse erreicht haben (Leu et al. 2001). Untersuchungen der Leber von Ratten ergaben eine Größenzunahme der Hepatozyten im Laufe der Entwicklung von 1 bis hin zu 16 Monaten. Bis zu einem Alter von 30 Monaten nahm die Zellgröße wieder ab, bis auf die Größe der Hepatozyten in den Tieren mit dem Alter von einem Monat (Schmucker et al. 1978). Das deutet auf verschiedenste Mechanismen des Wachstums in Abhängigkeit vom Alter hin. Aus unseren Ergebnissen, sowie aus denen von Leu (2001) und Schmucker (1978) kann man zusammenfassend feststellen, dass Wachstum kein linearer Vorgang während der Entwicklung eines Organs ist, sondern dass es altersabhängige und zelltypspezifische Effekte auf die Zunahme von Zellzahl und Zellgröße gibt.

### **5.3.3 Ausblick**

In den 11 Wochen alten Tieren ist offensichtlich die Kortikosteroidproduktion vor allem mit der Zellgröße und nicht mit der Zellzahl korreliert (Hoefflich et al. 2002). Vor allem nach der Feststellung, dass in jungen Mäusen die Zellen stark vergrößert sind im Vergleich zu den 11 Wochen alten Tieren, sollte man auf jeden Fall zusätzlich eine Bestimmung dieser Funktionsparameter durchführen, um festzustellen, ob auch in jungen Mäusen die Kortikosteroidproduktion mit der Zellgröße korreliert. Zusätzlich sollte man in dieser Altersgruppe die Signaltransduktionsanalyse vor allem auf Faktoren ausweiten, welche die Zellzahl beeinflussen. Auch ein direkter Vergleich beider Altersgruppe im Bezug auf solche Faktoren ist ein weiterer möglicher Versuchsansatz. Die Einbeziehung weiterer Altersgruppen ist sinnvoll für eine systematische Untersuchung der Entwicklung der Nebennieren in der Maus.

## 5.4 Schlußbetrachtung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Nebennieren von IGFBP-2 und GH transgenen Mäusen durch drei verschiedene Analyseverfahren untersucht.

Den Ansatz für die umfassende Analyse brachte eine Untersuchung, die gezeigt hatte, dass die durch GH ausgelöste Hypertrophie der Zona fasciculata Zellen in den Nebennieren der GH-transgenen Mäuse durch die Koexpression von IGFBP-2 vollständig aufgehoben werden konnte, aber die ebenfalls vorhandene Hyperplasie unberührt blieb (Hoefflich et al. 2002). Dieses Modell ist geeignet, die Regulation der Zellgröße getrennt zur Zellzahl zu untersuchen. Die Analysen sollten zeigen, auf welcher Ebene die durch IGFBP-2 induzierte Zellgrößenregulation stattfindet. Die Transkriptomanalyse mit Hilfe subtraktiver cDNA-Bibliotheken ermöglicht eine umfassende Untersuchung des Transkriptoms. Durch die gezielte Untersuchung spezifischer Proteinveränderungen mit Hilfe von Westernimmunoblots wird eine weitere Ebene der Regulationsmechanismen in der Zelle analysiert. Die große Vielfalt an verschiedenen Proteinen macht eine gezielte Auswahl der zu untersuchenden Komponenten notwendig. Daher haben wir uns zunächst für den PI3K-Weg entschieden. Dabei handelt es sich um den Hauptregulationsweg von Zellzahl und Zellgröße. Auch da beschränkten wir uns zunächst auf eine elementare Komponente, PDK, und analysierten von da ausgehend systematisch Veränderungen von weiter oberhalb und weiter unterhalb der Signalkaskade liegenden Komponenten. Um auch noch den zeitlichen Verlauf der Veränderungen zu bestimmen, wurden die identifizierten Mechanismen an 38 Tage alten Tieren und an 11 Wochen alten Tieren erhoben. Zur Vervollständigung wurden die Nebennieren der 38 Tage alten Tiere einer quantitativ-stereologischen Untersuchung unterzogen.

Die Ergebnisse der Proteinuntersuchung lassen sich durch die stereologische Untersuchung in beiden Altersgruppen bestätigen. In den 11 Wochen alten Tieren konnte eine Veränderung in der Aktivierung von PTEN und PDK festgestellt werden, die sich im Phänotyp widerspiegelt. In den 38 Tage alten Tieren konnten die Veränderungen in den Proteinuntersuchungen nicht nachgewiesen werden, aber hier konnte auch keine Veränderung der Zellgröße in den GB Tieren gesehen werden.

Auf der Transkriptomebene wurde nur ein Gen gefunden, das als Kandidat für Zellgrößenregulation in Frage kommt. Prp4 sollte auf jeden Fall auf Proteinebene in weitere Untersuchungen mit einbezogen werden.

Die weiteren Untersuchungen sollten sich auf zwei Schwerpunkte konzentrieren, einmal ist es interessant, was der Auslöser für die Aktivitätssteigerung von PTEN ist. Dabei wird bereits



versucht, in einer Arbeit einen Zusammenhang mit Integrinen herzustellen. Der zweite Ansatzpunkt ist die Suche nach Kandidaten unterhalb von PDK1. Daher kann man jetzt auch über eine holistische Proteomanalyse nachdenken, um mögliche völlig unbekannte Bindungsfaktoren zu identifizieren. Bereits bestehende Hinweise auf Bindungspartner, wie die Ral-GEFs und auch Prp4 können durch Immunopräzipitation überprüft werden.

Beinahe als Nebenbefund wurde bei der stereologisch-quantitativen Untersuchung eine genotypunabhängige Zellhypertrophie in den Zona fasciculata Zellen der Nebennieren in 38 Tage alten Tieren im Vergleich zu den 11 Wochen alten Tieren festgestellt. Unabhängig von den anderen Befunden stellt das einen völlig neuen Einblick in die morphologische Entwicklung der Nebennieren dar. Um es genauer zu charakterisieren, lohnt es sich die Nebennieren weiterer Altersgruppen morphologisch zu untersuchen und auch in den bereits untersuchten Gruppen die Tierzahl zu erhöhen, um ein umfassendes Bild zur Nebennierenentwicklung zu erhalten. Auch in diesem Zusammenhang erscheint es lohnend, vergleichend in den verschiedenen Altersgruppen nach Kandidaten zu suchen, deren Aktivitätsänderungen zunächst für die Hypertrophie und die anschließende Zellteilung verantwortlich sind.

## 6 Zusammenfassung

Wachstum zählt zu den elementaren Ereignissen im menschlichen Organismus. Das GH/IGF-System (Insulin-like-Growth-Factor System) spielt für das Wachstum eine wesentliche Rolle. IGFBP-2 stellt in diesem System einen wichtigen negativen Regulator dar. Durch die Verpaarung hemizygoter IGFBP-2-transgener mit hemizygoten GH-transgenen Tieren konnten wir ein Modell etablieren, in dem selektiv die Einflüsse von GH und IGFBP-2 untersucht werden können. IGFBP-2 ist in der Lage, in 11 Wochen alten Mäusen, die durch GH in den Zona fasciculata Zellen der Nebenniere ausgelöste Hypertrophie aufzuheben. Die ebenfalls vorhandene Hyperplasie hingegen bleibt bestehen. Dieses Modell wurde in der vorliegenden Arbeit durch Transkriptom-, Protein- und morphometrische Untersuchungen umfassend untersucht.

Die Transkriptomanalyse wurde an mRNA durchgeführt, die aus Nebennieren 11 Wochen alter Tiere isoliert wurde. Daraus wurden nach dem SSH-Verfahren subtraktive cDNA Bibliotheken erstellt und durch Microarrayanalysen mit der cDNA aus den Nebennieren 11 Wochen und 38 Tage alter Tiere untersucht.

Die Proteinuntersuchung erfolgte an Proteinextrakten aus den Nebennieren 11 Wochen und 38 Tage alter Tiere. Mit Hilfe von Westernimmunoblots und spezifischen Antikörpern wurde die Aktivität verschiedener Proteine aus dem PI3K-Weg untersucht. Der PI3K-Weg ist nach heutigem Wissensstand einer der Hauptwege für die Zellzahl- und Zellgrößenregulation.

Die morphometrischen Arbeiten wurden an 38 Tage alten Mäusen durchgeführt, um altersabhängige Veränderungen in der Nebenniere zu überprüfen. Dafür wurde die jeweils linke Nebenniere, nach einem Paraffinausguß zur Ermittlung des Volumens der einzelnen Rindenanteile, herangezogen und die jeweils rechte Nebenniere nach einer Präparation in Epon zur Bestimmung von Zellzahl und Zellgröße verwendet.

In der Transkriptomanalyse konnte Prp4, ein Bestandteil des Spleißosoms mit Serin/Threonin Kinase Funktion als mögliches Kandidatengen identifiziert werden. Das Experiment konnte durch einen zweiten experimentellen Ansatz, die qPCR, nicht bestätigt werden. Aber die Ähnlichkeit von Prp4 in der Proteinstruktur mit MAPK weist durchaus auf eine Funktion in der intrazellulären Signaltransduktion hin. Prp4 sollte auf jeden Fall bei weiteren Proteinuntersuchungen mit in die Analyse einbezogen werden.

In der Proteinuntersuchung konnten wir bei den 11 Wochen alten Tieren eine signifikant verminderte Aktivierung von PDK1, einem der Hauptsubstrate im PI3K-Weg, sowie eine

signifikante Erhöhung der Aktivierung von PTEN in GB transgenen Mäusen feststellen. PTEN ist ein negativer Regulator für die Aktivierung von PDK1. Bei der Untersuchung der Aktivierung bekannter Substrate von PDK1 konnten wir bislang keine Effekte auf weiterführende Signalwege beobachten.

In 38 Tage alten Tieren konnten wir hingegen keine Veränderung der Aktivierung von PTEN und PDK1 im Vergleich von GB zu G Tieren feststellen. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen aus der morphometrischen Analyse überein, bei der auch kein Effekt von IGFBP-2 auf die Zellgröße gesehen werden konnte.

Bemerkenswerterweise wurde bei der stereologisch-quantitativen Untersuchung festgestellt, dass die Zellen in der Zona fasciculata in der Nebenniere in 38 Tage alten Tieren im Vergleich zu den 11 Wochen alten Tieren um den Faktor drei größer sind, wohingegen die Anzahl deutlich niedriger ist. Nachdem die Nebenniere im Alter von 38 Tagen und 11 Wochen das selbe Volumen besitzt, kann man daraus schließen, dass in der Nebenniere einer jungen Maus Wachstum vor allem über eine Zunahme der Zellgröße zustande kommt und erst später Zellteilungsvorgänge einsetzen, die ohne eine weitere Massenzunahme der Zelle stattfinden. Unsere Ergebnisse zeigen eindeutig, dass der PI3K-Weg für die Zellgrößenregulation von Zona fasciculata Zellen der Nebenniere eine wichtige Rolle spielt.

## 7 Summary

### **Functional growth analysis in the adrenal gland of IGFBP-2 and GH-transgenic mice**

Growth represents one of the central processes in the mammalian/human organism. For the control of growth the GH/IGF-system plays a critical role, with IGFBP-2 as an *in vivo* relevant negative modulator.

By crossing hemizygous IGFBP-2-transgenic with hemizygous GH-transgenic animals, we could establish a model suitable for selective examination of effects mediated by GH/IGF-I and IGFBP-2. IGFBP-2 is able to antagonize the GH-induced hypertrophy in the zona fasciculata of the adrenal gland in 11 week old mice, whereas IGFBP-2 had no effect on GH dependent hyperplasia. This model was characterized by transcriptome and proteome analysis as well as by morphometric studies.

Transcriptome analysis was performed using mRNA isolated from adrenal glands of 11 week old animals. According to the SSH-protocol subtractive cDNA-libraries were established and analysed by microarray studies with cDNA derived from adrenal glands of 11 week old and 38 day old animals. Protein fractions were also extracted from mice of both groups of age. Activation of different signaling components from the PI3K-pathway, a well known regulatory system of cell size control, was examined by western immuno blots using specific antibodies. To gain further insights into age-dependent mechanisms, morphometric studies were conducted using tissue from the left adrenal gland of 38 day old mice for determination of the relations of different cortex fractions and from the right adrenal gland for cell number and cell size measurement.

Transcriptome analysis revealed a possible role of Prp4, a part of the spliceosome with ser/thr-kinase-function, as a candidate gene. Even, qPCR examinations did not confirm results from the transcriptome analysis. The similarity of Prp4 protein structure with that of MAPK might indicate to a function of Prp4 in intracellular signaling. In the future, Prp4 should be included in further proteome studies.

In 11 week old animals, we were able to show a decreased activation of PDK1, one of the main substrates in the PI3K-pathway, which might be due to the significant increase of PTEN activation found in GB-transgenic mice. PTEN is a negative modulator of PDK1 activation. To date, we were unable to identify specific alterations of known further downstream signaling components. 38 day old animals did not show any changes in activation patterns of

PTEN und PDK1 in GB groups compared to G groups. This result is in line with the morphometric analysis, where no effect of IGFBP-2 on cell size was observed.

Remarkably, the stereological-quantitative studies revealed the cells of the zona fasciculata being three-fold larger in 38 day old animals than in the 11 week old group. On the other hand, the cell number in the younger group was clearly reduced. As the adrenal glands in both age groups have almost identical volume, it might be concluded, that in the mouse adrenal gland growth is achieved by an increase of cell size and later by mitotic activity. Our results clearly show the important role of the PI3K-pathway for cell size control in the zona fasciculata cells from adrenal glands.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar (µmol/l)
4E-BP1	Initiations Faktor 4E Bindungsprotein
A	Fläche
A <sub>A</sub>	Flächendichte
ALS	Säurelabile Untereinheit
APS	Ammonium Persulfat
ATF1	activating transcription factor 1
B	IGFBP2 transgene Mäuse
bGH	bovines Wachstumshormon
Bp	Basenpaare (base pairs)
BSA	Albumin aus Rinderserum (bovine serum albumin)
bzw.	Beziehungsweise
C	nichttransgene Mäuse
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (cyclic adenosine monophosphate)
CBP	CREB-Binding Protein
CDK	cyklinabhängige Kinasen (cyclin dependent kinase)
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA (complementary deoxyribonucleic acid)
cm	Zentimeter
CMV Promoter	Cytomegalievirus Promoter
cpm	Impulse pro Minute (counts per minute)
CRK	CT10 regulator of kinase
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTPs	2'Desoxy-nucleotid 5'Triphosphat (deoxynucleotide triphosphates)
dpm	Zerfälle pro Minute (decays per minute)
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
ECM	extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGF	Epidermal Growth Factor
ERK1 / ERK2	extracellular signal-regulated Kinase 1 und 2
et al.	et altera
FAK	Fokale Adhäsions Kinase
FKHR	Forkhead Transkriptionsfaktor in rhabdomyosarcoma
G	GH-transgene Mäuse
g	Gramm
<i>g</i>	relative centrifugal force (RCF) ( $= 1,119 \times 10^{-5} \times \text{rpm}^2 \times r$ )
GB	doppeltransgene Mäuse mit GH-transgen und IGFBP-2 transgen
GH	Wachstumshormon (growth hormone)
GHR	GH-Rezeptor
G-Proteine	Guanosin-Triphosphat bindende Proteine
GRB	Growth Factor Receptor Bound Proteine
GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3
h	Stunde
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HBD	Heparinbindungsstelle
Hepes	(N-2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
<i>igf2</i>	IGF-II-Gen
IGFBP 1 – 6	IGF Bindungsproteine 1 – 6
IGFBPs	IGF-Bindungsproteine (IGF binding proteins)
IGF-I, -II	Insulin-like growth factor-I bzw. II
IGFIIR	IGF-Rezeptor Typ II
IGFIR	IGF-Rezeptor Typ I
Ilp45	Invasion Inhibitory Protein mit der Masse von 45 kDa
IL	Interleukin
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulin Rezeptor Substrat
JAK 1 und 2	Janus Kinase 1 und 2
JNK	c-Jun NH2-terminale Kinase
kb	Kilo Basenpaare (kilo basepairs)
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht

l	Liter
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar (mmol/l)
mRNA	messenger RNA
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
N	Zellzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N <sub>v</sub>	Numerische Dichte
OD	Optische Dichte
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PDK1	Phosphoinositide Dependent Kinase
PEPCK	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase
Pex 11 c	Peroxisomal biogenesis Factor 11 c
pg	Picogramm
PH	Pleckstrin-Homologie
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol 4,5-Biphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphat
PKB	Protein Kinase B
P <sub>p</sub>	Punktedichte
Prp4	Pre mRNA Processing Factor
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog deleted on Chromosome 10
Q	Partikel
Q <sup>-</sup>	Verschwindende Partikel



Ras	Rat Sarcoma
RB	Retinoblastom Protein (Regulatorprotein im Zellzyklus)
RGD	Arg-Gly-Asp (Integrinbindungsmotiv)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro min (rounds per minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunde
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
SF1	Stereoidogenesis Faktor 1
SH2	Src-Homologie Domänen
SHC	SH containing
SOCS	Suppressor of Cytokine Signaling
SOS	Son of Sevenless
SSH	Suppression Subtractive Hybridization
STATs	Signal transducers and activators of transcription
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (Tris buffered saline)
Temed	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
tg	Transgen
TNF	Tumornekrosefaktor (tumor necrosis factor)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC 1 / TSC 2	Tuberous Sclerosis Complex Protein 1 und 2
U	Unit
UV	Ultra-Violett
V	Absolutschätzwert für das Volumen
v	mittleres Zellvolumen
V	Volt
V <sub>v</sub>	Volumendichte
wt	Wildtyp

z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
SPF	Spezifiziert pathogen frei

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der dreidimensionalen Strukturen von Insulin, Proinsulin und IGF (Blundell & Humbel 1980).....	6
Abbildung 2: Hauptsignalwege der Regulation von Zellzahl und Zellgröße durch den IGFIR (Hoeflich A. et al. 2005).....	15
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Ablaufs der Suppression Subtractive Hybridisation (SSH)-Methode. ....	26
Abbildung 4: Zona fasciculata Zellen der Nebennierenrinde weisen in GH-transgenen Mäusen (G) sowohl ein vergrößertes Zellvolumen (a), als auch eine erhöhte Zellzahl (b) auf. Durch die Koexpression von IGFBP-2 in GH transgenen Mäusen (GB) wird das Zellvolumen normalisiert, nicht jedoch die Zellzahl. ....	28
Abbildung 5: Versuchstierkollektiv (Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. S. Nedbal).....	40
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Perfusionsfixation.....	46
Abbildung 7: Aufbau eines Westernblots .....	63
Abbildung 8: Zwei deckungsgleiche Ausschnitte aus einer Nebenniere mit einem Abstand von 1,5 µm in einem erwartungstreuen Testfeld nach Gundersen.....	69
Abbildung 9: PCR für den Nachweis des IGFBP-2-Transgens .....	72
Abbildung 10: PCR für den Nachweis des GH Transgens .....	73
Abbildung 11: Isolierung der Gesamt-RNA aus den Nebennieren von 11 Wochen alten Tieren .....	74
Abbildung 12: Gelanalyse der Produkte aus der Kolonie-PCR. ....	75
Abbildung 13: Herstellung von cDNA-Arrays .....	76
Abbildung 14: Analyse der cDNA nach der Umschreibung aus Nebennieren RNA.....	77
Abbildung 15: IGFBP-2 (BP2) Expression in 11 Wochen alten Tieren. ....	79
Abbildung 16: Expression von pre mRNA processing factor (Prp4) in den Nebennieren von 11 Wochen alten Tieren. ....	80
Abbildung 17: Isolierung der Gesamt-RNA aus den Nebennieren der 38 Tage alten GH und doppeltransgenen Tiere .....	80
Abbildung 18: IGFBP-2 (BP2) mRNA Expression in 38 Tage alten Tieren.....	81
Abbildung 19: Expression von Prp 4 (pre mRNA processing factor) und Peroxisomal biogenesis factor 11 c (Pex11c) in 38 Tage alten Tieren .....	82
Abbildung 20: Standardkurve für das Gen Prp 4 über 7 Verdünnungsstufen.....	84
Abbildung 21: Standardkurve für das Gen Pex11 c über 7 Verdünnungsstufen .....	84
Abbildung 22: Standardkurve für das Gen $\beta$ -Aktin über 7 Verdünnungsstufen.....	85
Abbildung 23: Kalibrierte Mittelwerte (mean $\pm$ SD) nach der qPCR für das Gen PRP4 in 5 Wochen alten Tieren (N=3 in GB und C; N=2 in G). ....	85
Abbildung 24: Kalibrierte Mittelwerte (mean $\pm$ SD) nach der qPCR für das Gen Prp4 in 11 Wochen alten Tieren (N=3).....	86
Abbildung 25: Kalibrierte Mittelwerte (mean $\pm$ SD) nach der qPCR für das Gen Pex11c in 5 Wochen alten Tieren (N=3 in GB und C; N=2 in G). ....	86
Abbildung 26: Darstellung einer Coomassiefärbung nach einem erfolgreichen Proteintransfer von einem SDS-Gel auf eine ImmobilonP-PVDF-Membran. ....	88
Abbildung 27: Phosphorylierung von PTEN in Gewebeextrakten aus der Nebenniere von nicht transgenen (C), IGFBP-2 (B), GH (G) und doppelt transgenen (GB) 11 Wochen alten Mäusen .....	89

Abbildung 28: Phosphorylierung von PDK1 in Gewebeextrakten aus der Nebenniere von nicht transgenen (C), IGFBP-2 (B), GH (G) und doppelt transgenen (GB) von 11 Wochen alten Mäusen. ....	89
Abbildung 29: Phosphorylierung von Akt (Thr 308), pGSK 3 und pmTOR in Gewebeextrakten aus der Nebenniere von nicht transgenen (C), IGFBP-2 (B), GH (G) und doppelt transgenen (GB) Mäusen.....	90
Abbildung 30: Phosphorylierung von PTEN in Gewebeextrakten aus der Nebenniere von nicht transgenen (C), IGFBP-2 (B), GH (G) und doppelt transgenen (GB) 38 Tage alten Mäusen .....	90
Abbildung 31: Phosphorylierung von PDK1 in Gewebeextrakten aus der Nebenniere von nicht transgenen (C), IGFBP-2 (B), GH (G) und doppelt transgenen (GB) 38 Tage alten Mäusen. ....	91
Abbildung 32: Gewicht der Nebennieren der 38 Tage alten Mäuse aller 4 Genotypen.. ....	92
Abbildung 33: Volumen der Nebennierenrinde ( $V_{\text{(Rinde, Nebenniere)}}$ ). ....	93
Abbildung 34: Volumendichte der Zone X ( $V_{\text{V(Zone X/Nebenniere)}}$ ) der Nebenniere.....	94
Abbildung 35: Absolutes Volumen der Zona fasciculata der Nebennieren ( $V_{\text{(Zona fasciculata, Nebenniere)}}$ ). ....	94
Abbildung 36: Absolute Zahl ( $N_{\text{(Zona fasciculata, Nebenniere)}}$ ) der Zona fasciculata Zellen der Nebennieren .....	95
Abbildung 37: Mittleres Volumen der Zona fasciculata Zellen (v) .....	96

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung einer Reaktion der IGFBP-2 PCR .....	42
Tabelle 2: Reaktionsbedingungen für die IGFBP-2 PCR .....	42
Tabelle 3: Zusammensetzung einer Reaktion der PEPCK-bGH PCR .....	43
Tabelle 4: Reaktionsbedingungen für die PEPCK-bGH PCR .....	43
Tabelle 5: Zusammensetzung einer Reaktion der Kolonie-PCR .....	48
Tabelle 6: Reaktionsbedingungen für die Kolonie-PCR.....	49
Tabelle 7: Zusammensetzung einer Reaktion .....	56
Tabelle 8: Reaktionsbedingungen für die Test PCR .....	56
Tabelle 9: Zusammensetzung einer Reaktion für die Standardkurve der qPCR.....	58
Tabelle 10: Reaktionsbedingungen in einem Applied Biosystems 7000 Sequence Detection System .....	58
Tabelle 11: Gene mit signifikanten Expressionsunterschieden zwischen G und GB .....	82

## 11 Literaturverzeichnis

Alahari, S. K., Schmidt, H. & Kaufer, N. F. 1993. The fission yeast *prp4+* gene involved in pre-mRNA splicing codes for a predicted serine/threonine kinase and is essential for growth. *Nucleic Acids Res.* 21: 4079-4083.

Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B. & Cohen, P. 1997. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B. *Curr.Biol.* 7: 261-269.

Anderson, M. F., Aberg, M. A., Nilsson, M. & Eriksson, P. S. 2002. Insulin-like growth factor-I and neurogenesis in the adult mammalian brain. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 134: 115-122.

Andjelkovic, M., Alessi, D. R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N. J., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, J. M. & Hemmings, B. A. 1997. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J.Biol.Chem.* 272: 31515-31524.

Andress, D. L. 2001. IGF-binding protein-5 stimulates osteoblast activity and bone accretion in ovariectomized mice. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 281: E283-E288.

Argetsinger, L. S., Campbell, G. S., Yang, X., Witthuhn, B. A., Silvennoinen, O., Ihle, J. N. & Carter-Su, C. 1993. Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell* 74: 237-244.

Bach, L. A. 1999. Insulin-like growth factor binding protein-6: the "forgotten" binding protein? *Horm.Metab Res.* 31: 226-234.

Badr, F. M., Shire, J. G. & Spickett, S. G. 1968. Genetic variation in adrenal weight: strain differences in the development of the adrenal glands of mice. *Acta Endocrinol.(Copenh)* 58: 191-201.

Baker, J., Liu, J. P., Robertson, E. J. & Efstratiadis, A. 1993. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75: 73-82.

Bangur, C. S., Switzer, A., Fan, L., Marton, M. J., Meyer, M. R. & Wang, T. 2002. Identification of genes over-expressed in small cell lung carcinoma using suppression subtractive hybridization and cDNA microarray expression analysis. *Oncogene* 21: 3814-3825.

Bauersachs, S., Blum, H., Mallok, S., Wenigerkind, H., Rief, S., Prella, K. & Wolf, E. 2003. Regulation of ipsilateral and contralateral bovine oviduct epithelial cell function in the postovulation period: a transcriptomics approach. *Biol.Reprod.* 68: 1170-1177.

Bauersachs, S., Rehfeld, S., Ulbrich, S. E., Mallok, S., Prella, K., Wenigerkind, H., Einspanier, R., Blum, H. & Wolf, E. 2004. Monitoring gene expression changes in bovine oviduct epithelial cells during the oestrous cycle. *J.Mol.Endocrinol.* 32: 449-466.

- Bauersachs, S., Ulbrich, S. E., Gross, K., Schmidt, S. E. M., Meyer, H. H. D., Einspanier, R., Wenigerkind, H., Vermehren, M., Blum, H., Sinowatz, F. & Wolf, E. 2005. Gene Expression Profiling of Bovine Endometrium During the Oestrous Cycle. *Journal of Molecular Endocrinology*.
- Behringer, R. R., Lewin, T. M., Quaife, C. J., Palmiter, R. D., Brinster, R. L. & D'Ercole, A. J. 1990. Expression of insulin-like growth factor I stimulates normal somatic growth in growth hormone-deficient transgenic mice. *Endocrinology* 127: 1033-1040.
- Beitner-Johnson, D., Blakesley, V. A., Shen-Orr, Z., Jimenez, M., Stannard, B., Wang, L. M., Pierce, J. & LeRoith, D. 1996. The proto-oncogene product c-Crk associates with insulin receptor substrate-1 and 4PS. Modulation by insulin growth factor-I (IGF) and enhanced IGF-I signaling. *J.Biol.Chem.* 271: 9287-9290.
- Berelowitz, M., Szabo, M., Frohman, L. A., Firestone, S., Chu, L. & Hintz, R. L. 1981. Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary. *Science* 212: 1279-1281.
- Beuschlein, F., Mutch, C., Bavers, D. L., Ulrich-Lai, Y. M., Engeland, W. C., Keegan, C. & Hammer, G. D. 2002. Steroidogenic factor-1 is essential for compensatory adrenal growth following unilateral adrenalectomy. *Endocrinology* 143: 3122-3135.
- Bienvenu, G., Seurin, D., Grellier, P., Froment, P., Baudrimont, M., Monget, P., Le Bouc, Y. & Babajko, S. 2004. IGFBP-6 transgenic mice: post-natal growth, brain development and reproduction abnormalities. *Endocrinology*.
- Billestrup, N., Bouchelouche, P., Allevato, G., Ilondo, M. & Nielsen, J. H. 1995. Growth hormone receptor C-terminal domains required for growth hormone-induced intracellular free Ca<sup>2+</sup> oscillations and gene transcription. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92: 2725-2729.
- Biondi, R. M. & Nebreda, A. R. 2003. Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. *Biochem.J.* 372: 1-13.
- Birger, Y., Shemer, R., Perk, J. & Razin, A. 1999. The imprinting box of the mouse Igf2r gene. *Nature* 397: 84-88.
- Blakesley, V. A., Scrimgeour, A., Esposito, D. & Le Roith, D. 1996. Signaling via the insulin-like growth factor-I receptor: does it differ from insulin receptor signaling? *Cytokine Growth Factor Rev.* 7: 153-159.
- Bland, M. L., Jamieson, C. A., Akana, S. F., Bornstein, S. R., Eisenhofer, G., Dallman, M. F. & Ingraham, H. A. 2000. Haploinsufficiency of steroidogenic factor-1 in mice disrupts adrenal development leading to an impaired stress response. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97: 14488-14493.
- Blundell, T. L. & Humbel, R. E. 1980. Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors. *Nature* 287: 781-787.
- Boulle, N., Logie, A., Gicquel, C., Perin, L. & Le Bouc, Y. 1998. Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 83: 1713-1720.

- Brancho, D., Tanaka, N., Jaeschke, A., Ventura, J. J., Kelkar, N., Tanaka, Y., Kyuuma, M., Takeshita, T., Flavell, R. A. & Davis, R. J. 2003. Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev.* 17: 1969-1978.
- Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J. & Guillemin, R. 1973. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179: 77-79.
- Brem, G., Wanke, R., Wolf, E., Buchmuller, T., Muller, M., Brenig, B. & Hermanns, W. 1989. Multiple consequences of human growth hormone expression in transgenic mice. *Mol.Biol.Med.* 6: 531-547.
- BRENNER, R. M. 1963. Radioautographic studies with tritiated thymidine of cell migration in the mouse adrenal after a carbon tetrachloride stress. *Am.J.Anat* 112: 81-95.
- Bueno, O. F., De Windt, L. J., Tymitz, K. M., Witt, S. A., Kimball, T. R., Klevitsky, R., Hewett, T. E., Jones, S. P., Lefer, D. J., Peng, C. F., Kitsis, R. N. & Molkentin, J. D. 2000. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J.* 19: 6341-6350.
- Butler, A. A. & Le Roith, D. 2001. Control of growth by the somatotropic axis: growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles. *Annu.Rev.Physiol* 63: 141-164.
- Butler, A. A., Yakar, S., Gewolb, I. H., Karas, M., Okubo, Y. & LeRoith, D. 1998. Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology. *Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.* 121: 19-26.
- Byrd, J. C., Park, J. H., Schaffer, B. S., Garmroudi, F. & MacDonald, R. G. 2000. Dimerization of the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor. *J.Biol.Chem.* 275: 18647-18656.
- Carro, E., Senaris, R., Considine, R. V., Casanueva, F. F. & Dieguez, C. 1997. Regulation of in vivo growth hormone secretion by leptin. *Endocrinology* 138: 2203-2206.
- Carro, E., Seoane, L. M., Senaris, R., Considine, R. V., Casanueva, F. F. & Dieguez, C. 1998. Interaction between leptin and neuropeptide Y on in vivo growth hormone secretion. *Neuroendocrinology* 68: 187-191.
- Carter-Su, C. & Smit, L. S. 1998. Signaling via JAK tyrosine kinases: growth hormone receptor as a model system. *Recent Prog.Horm.Res.* 53: 61-82.
- Casamayor, A., Torrance, P. D., Kobayashi, T., Thorner, J. & Alessi, D. R. 1999. Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Curr.Biol.* 9: 186-197.
- Chen, C., Tao, S., Shai, R., Mischel, P., Liao, L., Pintar, J., Horvath, S., Nelson, S. & Sawyers, C. IGFBP-2 as a surrogate marker for the PTEN/Akt signaling. *Growth Horm.IGF.Res.* 14, 117. 2004.  
Ref Type: Abstract
- Chen, H. J., Yuan, J. & Lobel, P. 1997. Systematic mutational analysis of the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor cytoplasmic domain.



An acidic cluster containing a key aspartate is important for function in lysosomal enzyme sorting. *J.Biol.Chem.* 272: 7003-7012.

Cho, K. S., Lee, J. H., Kim, S., Kim, D., Koh, H., Lee, J., Kim, C., Kim, J. & Chung, J. 2001. Drosophila phosphoinositide-dependent kinase-1 regulates apoptosis and growth via the phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98: 6144-6149.

Clark, R. G., Carlsson, L. M. & Robinson, I. C. 1987. Growth hormone secretory profiles in conscious female rats. *J.Endocrinol.* 114: 399-407.

Clemmons, D. R. 2004. Role of insulin-like growth factor in maintaining normal glucose homeostasis. *Horm.Res.* 62 Suppl 1: 77-82.

Coelho, C. M. & Leivers, S. J. 2000. Do growth and cell division rates determine cell size in multicellular organisms? *J.Cell Sci.* 113: 2927-2934.

Conlon, I. & Raff, M. 1999. Size control in animal development. *Cell* 96: 235-244.

Conover, C. A., Kiefer, M. C. & Zapf, J. 1993. Posttranslational regulation of insulin-like growth factor binding protein-4 in normal and transformed human fibroblasts. Insulin-like growth factor dependence and biological studies. *J.Clin.Invest* 91: 1129-1137.

Cosman, D., Lyman, S. D., Idzerda, R. L., Beckmann, M. P., Park, L. S., Goodwin, R. G. & March, C. J. 1990. A new cytokine receptor superfamily. *Trends Biochem.Sci.* 15: 265-270.

D'Ercole, A. J., Applewhite, G. T. & Underwood, L. E. 1980. Evidence that somatomedin is synthesized by multiple tissues in the fetus. *Dev.Biol.* 75: 315-328.

D'Ercole, A. J., Dai, Z., Xing, Y., Boney, C., Wilkie, M. B., Lauder, J. M., Han, V. K. & Clemmons, D. R. 1994. Brain growth retardation due to the expression of human insulin like growth factor binding protein-1 in transgenic mice: an in vivo model for the analysis of igf function in the brain. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 82: 213-222.

Dai, Z., Xing, Y., Boney, C. M., Clemmons, D. R. & D'Ercole, A. J. 1994. Human insulin-like growth factor-binding protein-1 (hIGFBP-1) in transgenic mice: characterization and insights into the regulation of IGFBP-1 expression. *Endocrinology* 135: 1316-1327.

Date, Y., Murakami, N., Kojima, M., Kuroiwa, T., Matsukura, S., Kangawa, K. & Nakazato, M. 2000. Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 275: 477-480.

Daughaday, W. H., Hall, K., Raben, M. S., Salmon, W. D., Jr., Van den Brande, J. L. & Van Wyk, J. J. 1972. Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature* 235: 107.

Daughaday, W. H. & Reeder, C. 1966. Synchronous activation of DNA synthesis in hypophysectomized rat cartilage by growth hormone. *J.Lab Clin.Med.* 68: 357-368.

DENKO, C. W. & BERGENSTAL, D. M. 1955. The effect of hypophysectomy and growth hormone on S35 fixation in cartilage. *Endocrinology* 57: 76-86.

- Devlin, R. D., Du, Z., Buccilli, V., Jorgetti, V. & Canalis, E. 2002. Transgenic mice overexpressing insulin-like growth factor binding protein-5 display transiently decreased osteoblastic function and osteopenia. *Endocrinology* 143: 3955-3962.
- Di Cristofano, A., Kotsi, P., Peng, Y. F., Cordon-Cardo, C., Elkon, K. B. & Pandolfi, P. P. 1999. Impaired Fas response and autoimmunity in *Pten*<sup>+/-</sup> mice. *Science* 285: 2122-2125.
- Di Cristofano, A. & Pandolfi, P. P. 2000. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* 100: 387-390.
- Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C. & Pandolfi, P. P. 1998. *Pten* is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat.Genet.* 19: 348-355.
- Diatchenko, L., Lau, Y. F., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D. & Siebert, P. D. 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93: 6025-6030.
- Dickey, C. A., Loring, J. F., Montgomery, J., Gordon, M. N., Eastman, P. S. & Morgan, D. 2003. Selectively reduced expression of synaptic plasticity-related genes in amyloid precursor protein + presenilin-1 transgenic mice. *J.Neurosci.* 23: 5219-5226.
- Diehl, D., Hoeflich, A., Wolf, E. & Lahm, H. 2004. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 inhibits colony formation of colorectal cancer cells by IGF-independent mechanisms. *Cancer Res.* 64: 1600-1603.
- Diehl, D., Lahm, H., Wolf, E. & Bauersachs, S. 2005. Transcriptome analysis of a human colorectal cancer cell line shows molecular targets of insulin-like growth factor-binding protein-4 overexpression. *Int.J.Cancer* 113: 588-599.
- Dinerstein, H., Lago, F., Goujon, L., Ferrag, F., Esposito, N., Finidori, J., Kelly, P. A. & Postel-Vinay, M. C. 1995. The proline-rich region of the GH receptor is essential for JAK2 phosphorylation, activation of cell proliferation, and gene transcription. *Mol.Endocrinol.* 9: 1701-1707.
- Duan, C. & Clemmons, D. R. 1998. Differential expression and biological effects of insulin-like growth factor-binding protein-4 and -5 in vascular smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* 273: 16836-16842.
- Dufner, A. & Thomas, G. 1999. Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp.Cell Res.* 253: 100-109.
- Durham, S. K., De Leon, D. D., Okazaki, R., Riggs, B. L. & Conover, C. A. 1995. Regulation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 availability in normal human osteoblast-like cells: role of endogenous IGFs. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 80: 104-110.
- Eden, S. 1979. Age- and sex-related differences in episodic growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 105: 555-560.
- Efstratiadis, A. 1998. Genetics of mouse growth. *Int.J.Dev.Biol.* 42: 955-976.

- Fingar, D. C., Salama, S., Tsou, C., Harlow, E. & Blenis, J. 2002. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev.* 16: 1472-1487.
- Firth, C. H. 1983. Histology, Adrenal Gland, Mouse. In Jones, T. C., Mohr, U. & Hunt, R. D. (Eds) *Endocrine System* (pp. 8-15). Berlin Heidelberg New York Tokyo: Springer-Verlag.
- Fisher, T. L. & White, M. F. 2004. Signaling pathways: the benefits of good communication. *Curr.Biol.* 14: R1005-R1007.
- Fowlkes, J. L., Thrailkill, K. M., George-Nascimento, C., Rosenberg, C. K. & Serra, D. M. 1997. Heparin-binding, highly basic regions within the thyroglobulin type-1 repeat of insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins (IGFBPs) -3, -5, and -6 inhibit IGFBP-4 degradation. *Endocrinology* 138: 2280-2285.
- FRANKHAUSER, R. 1952. [Some aspects of asymmetry in animals]. *Schweiz.Arch.Neurol.Psychiatr.* 70: 151-154.
- Frasca, F., Pandini, G., Scalia, P., Sciacca, L., Mineo, R., Costantino, A., Goldfine, I. D., Belfiore, A. & Vigneri, R. 1999. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol.Cell Biol.* 19: 3278-3288.
- Frattali, A. L. & Pessin, J. E. 1993. Relationship between alpha subunit ligand occupancy and beta subunit autophosphorylation in insulin/insulin-like growth factor-1 hybrid receptors. *J.Biol.Chem.* 268: 7393-7400.
- Garl, P. J., Wenzlau, J. M., Walker, H. A., Whitelock, J. M., Costell, M. & Weiser-Evans, M. C. 2004. Perlecan-induced suppression of smooth muscle cell proliferation is mediated through increased activity of the tumor suppressor PTEN. *Circ.Res.* 94: 175-183.
- Gimm, O., Perren, A., Weng, L. P., Marsh, D. J., Yeh, J. J., Ziebold, U., Gil, E., Hinze, R., Delbridge, L., Lees, J. A., Mutter, G. L., Robinson, B. G., Komminoth, P., Dralle, H. & Eng, C. 2000. Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors. *Am.J.Pathol.* 156: 1693-1700.
- Gnanapavan, S., Kola, B., Bustin, S. A., Morris, D. G., McGee, P., Fairclough, P., Bhattacharya, S., Carpenter, R., Grossman, A. B. & Korbonits, M. 2002. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 87: 2988.
- Goberdhan, D. C., Paricio, N., Goodman, E. C., Mlodzik, M. & Wilson, C. 1999. Drosophila tumor suppressor PTEN controls cell size and number by antagonizing the Chico/PI3-kinase signaling pathway. *Genes Dev.* 13: 3244-3258.
- Goberdhan, D. C. & Wilson, C. 1998. JNK, cytoskeletal regulator and stress response kinase? A Drosophila perspective. *Bioessays* 20: 1009-1019.
- Goberdhan, D. C. & Wilson, C. 2003a. PTEN: tumour suppressor, multifunctional growth regulator and more. *Hum.Mol.Genet.* 12 Suppl 2: R239-R248.
- Goberdhan, D. C. & Wilson, C. 2003b. The functions of insulin signaling: size isn't everything, even in Drosophila. *Differentiation* 71: 375-397.

- Grewal, S. S. & Edgar, B. A. 2003. Controlling cell division in yeast and animals: does size matter? *J.Biol.* 2: 5.
- Groszer, M., Erickson, R., Scripture-Adams, D. D., Lesche, R., Trumpp, A., Zack, J. A., Kornblum, H. I., Liu, X. & Wu, H. 2001. Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene in vivo. *Science* 294: 2186-2189.
- Gu, J., Tamura, M. & Yamada, K. M. 1998. Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways. *J.Cell Biol.* 143: 1375-1383.
- Guler, H. P., Zapf, J., Schmid, C. & Froesch, E. R. 1989. Insulin-like growth factors I and II in healthy man. Estimations of half-lives and production rates. *Acta Endocrinol.(Copenh)* 121: 753-758.
- Gundersen, H. J. G. 1977. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary particles: the edge effect. *J.Microsc.* 111: 219-233.
- Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R. & Aebersold, R. 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol.Cell Biol.* 19: 1720-1730.
- Haluzik, M., Yakar, S., Gavrilova, O., Setser, J., Boisclair, Y. & LeRoith, D. 2003. Insulin resistance in the liver-specific IGF-1 gene-deleted mouse is abrogated by deletion of the acid-labile subunit of the IGF-binding protein-3 complex: relative roles of growth hormone and IGF-1 in insulin resistance. *Diabetes* 52: 2483-2489.
- Hammer, G. D., Parker, K. L. & Schimmer, B. P. 2005. Minireview: transcriptional regulation of adrenocortical development. *Endocrinology* 146: 1018-1024.
- Hansen, J. A., Lindberg, K., Hilton, D. J., Nielsen, J. H. & Billestrup, N. 1999. Mechanism of inhibition of growth hormone receptor signaling by suppressor of cytokine signaling proteins. *Mol.Endocrinol.* 13: 1832-1843.
- Hatano, O., Takayama, K., Imai, T., Waterman, M. R., Takakusu, A., Omura, T. & Morohashi, K. 1994. Sex-dependent expression of a transcription factor, Ad4BP, regulating steroidogenic P-450 genes in the gonads during prenatal and postnatal rat development. *Development* 120: 2787-2797.
- Hataya, Y., Akamizu, T., Takaya, K., Kanamoto, N., Ariyasu, H., Saijo, M., Moriyama, K., Shimatsu, A., Kojima, M., Kangawa, K. & Nakao, K. 2001. A low dose of ghrelin stimulates growth hormone (GH) release synergistically with GH-releasing hormone in humans. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 86: 4552.
- He, W., Craparo, A., Zhu, Y., O'Neill, T. J., Wang, L. M., Pierce, J. H. & Gustafson, T. A. 1996. Interaction of insulin receptor substrate-2 (IRS-2) with the insulin and insulin-like growth factor I receptors. Evidence for two distinct phosphotyrosine-dependent interaction domains within IRS-2. *J.Biol.Chem.* 271: 11641-11645.
- Heemskerk, V. H., Daemen, M. A. & Buurman, W. A. 1999. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and growth hormone (GH) in immunity and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 10: 5-14.

- Hensleigh, H. C. & Weitlauf, H. M. 1974. Effect of delayed implantation on dry weight and lipid content of mouse blastocysts. *Biol.Reprod.* 10: 315-320.
- Hentges, K. E., Sirry, B., Gingeras, A. C., Sarbassov, D., Sonenberg, N., Sabatini, D. & Peterson, A. S. 2001. FRAP/mTOR is required for proliferation and patterning during embryonic development in the mouse. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98: 13796-13801.
- Hoeflich A., Lahm H. & Wolf E. 2005. Molekulare Mechanismen der Wachstumswirkung des IGF-Systems. In D.Ganten und K.Ruckpaul (Ed) *Molekularmedizinische Grundlagen von Endokrinopathien 2 - Para- und autokrine Regulation* Springer Verlag Heidelberg (in Press).
- Hoeflich, A., Fettscher, O., Lahm, H., Blum, W. F., Kolb, H. J., Engelhardt, D., Wolf, E. & Weber, M. M. 2000. Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 results in increased tumorigenic potential in Y-1 adrenocortical tumor cells. *Cancer Res.* 60: 834-838.
- Hoeflich, A., Nedbal, S., Blum, W. F., Erhard, M., Lahm, H., Brem, G., Kolb, H. J., Wanke, R. & Wolf, E. 2001a. Growth inhibition in giant growth hormone transgenic mice by overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2. *Endocrinology* 142: 1889-1898.
- Hoeflich, A., Reisinger, R., Lahm, H., Kiess, W., Blum, W. F., Kolb, H. J., Weber, M. M. & Wolf, E. 2001b. Insulin-like growth factor-binding protein 2 in tumorigenesis: protector or promoter? *Cancer Res.* 61: 8601-8610.
- Hoeflich, A., Schmidt, P., Foll, J., Rottmann, O., Weber, M. M., Kolb, H. J., Pirchner, F. & Wolf, E. 1998. Altered growth of mice divergently selected for body weight is associated with complex changes in the growth hormone/insulin-like growth factor system. *Growth Horm.IGF.Res.* 8: 113-123.
- Hoeflich, A., Weber, M. M., Fisch, T., Nedbal, S., Fottner, C., Elmlinger, M. W., Wanke, R. & Wolf, E. 2002. Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) separates hypertrophic and hyperplastic effects of growth hormone (GH)/IGF-I excess on adrenocortical cells in vivo. *FASEB J.* 16: 1721-1731.
- Hoeflich, A., Wu, M., Mohan, S., Foll, J., Wanke, R., Froehlich, T., Arnold, G. J., Lahm, H., Kolb, H. J. & Wolf, E. 1999. Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in transgenic mice reduces postnatal body weight gain. *Endocrinology* 140: 5488-5496.
- Horowitz, D. S., Lee, E. J., Mabon, S. A. & Misteli, T. 2002. A cyclophilin functions in pre-mRNA splicing. *EMBO J.* 21: 470-480.
- Huang, C. Y., Hao, L. Y. & Buetow, D. E. 2002. Insulin-like growth factor-induced hypertrophy of cultured adult rat cardiomyocytes is L-type calcium-channel-dependent. *Mol.Cell Biochem.* 231: 51-59.
- Huang, H., Rajkumar, K. & Murphy, L. J. 1997. Reduced fecundity in insulin-like growth factor-binding protein-1 transgenic mice. *Biol.Reprod.* 56: 284-289.
- Huang, Y., Deng, T. & Winston, B. W. 2000. Characterization of hPRP4 kinase activation: potential role in signaling. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 271: 456-463.

- Hunter, J. J., Tanaka, N., Rockman, H. A., Ross, J., Jr. & Chien, K. R. 1995. Ventricular expression of a MLC-2v-ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice. *J.Biol.Chem.* 270: 23173-23178.
- Ikeda, Y., Shen, W. H., Ingraham, H. A. & Parker, K. L. 1994. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol.Endocrinol.* 8: 654-662.
- Imaki, T., Shibasaki, T., Shizume, K., Masuda, A., Hotta, M., Kiyosawa, Y., Jibiki, K., Demura, H., Tsushima, T. & Ling, N. 1985. The effect of free fatty acids on growth hormone (GH)-releasing hormone-mediated GH secretion in man. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 60: 290-293.
- Irving, J. A. & Lala, P. K. 1995. Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF-beta, IGF-II, and IGFBP-1. *Exp.Cell Res.* 217: 419-427.
- Jaques, G., Noll, K., Wegmann, B., Witten, S., Kogan, E., Radulescu, R. T. & Havemann, K. 1997. Nuclear localization of insulin-like growth factor binding protein 3 in a lung cancer cell line. *Endocrinology* 138: 1767-1770.
- Johnston, G. C., Pringle, J. R. & Hartwell, L. H. 1977. Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp.Cell Res.* 105: 79-98.
- Jones, J. I. & Clemmons, D. R. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr.Rev.* 16: 3-34.
- Jope, R. S. & Johnson, G. V. 2004. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem.Sci.* 29: 95-102.
- Junger, M. A., Rintelen, F., Stocker, H., Wasserman, J. D., Vegh, M., Radimerski, T., Greenberg, M. E. & Hafen, E. 2003. The *Drosophila* Forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling. *J.Biol.* 2: 20.
- Kanzaki, S., Hilliker, S., Baylink, D. J. & Mohan, S. 1994. Evidence that human bone cells in culture produce insulin-like growth factor-binding protein-4 and -5 proteases. *Endocrinology* 134: 383-392.
- Kiess, W., Haskell, J. F., Lee, L., Greenstein, L. A., Miller, B. E., Aarons, A. L., Rechler, M. M. & Nissley, S. P. 1987. An antibody that blocks insulin-like growth factor (IGF) binding to the type II IGF receptor is neither an agonist nor an inhibitor of IGF-stimulated biologic responses in L6 myoblasts. *J.Biol.Chem.* 262: 12745-12751.
- Kishimoto, H., Hamada, K., Saunders, M., Backman, S., Sasaki, T., Nakano, T., Mak, T. W. & Suzuki, A. 2003. Physiological functions of Pten in mouse tissues. *Cell Struct.Funct.* 28: 11-21.
- Klapper, D. G., Svoboda, M. E. & Van Wyk, J. J. 1983. Sequence analysis of somatomedin-C: confirmation of identity with insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 112: 2215-2217.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H. & Kangawa, K. 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-660.

- Koolman, J. & Röhm, K.-H. 1998. Hormone. In Koolman, J. & Röhm, K.-H. (Eds) Taschenatlas der Biochemie (pp. 350-371). Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Kornfeld, S. 1992. Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu.Rev.Biochem.* 61: 307-330.
- Kozma, S. C. & Thomas, G. 2002. Regulation of cell size in growth, development and human disease: PI3K, PKB and S6K. *Bioessays* 24: 65-71.
- Kramer, J. M., Davidge, J. T., Lockyer, J. M. & Staveley, B. E. 2003. Expression of Drosophila FOXO regulates growth and can phenocopy starvation. *BMC.Dev.Biol.* 3: 5.
- Kubota, N., Tobe, K., Terauchi, Y., Eto, K., Yamauchi, T., Suzuki, R., Tsubamoto, Y., Komeda, K., Nakano, R., Miki, H., Satoh, S., Sekihara, H., Sciacchitano, S., Lesniak, M., Aizawa, S., Nagai, R., Kimura, S., Akanuma, Y., Taylor, S. I. & Kadowaki, T. 2000. Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes* 49: 1880-1889.
- Lalou, C., Lassarre, C. & Binoux, M. 1996. A proteolytic fragment of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 that fails to bind IGFs inhibits the mitogenic effects of IGF-I and insulin. *Endocrinology* 137: 3206-3212.
- Lamothe, B., Bucchini, D., Jami, J. & Joshi, R. L. 1995. Interaction of p85 subunit of PI 3-kinase with insulin and IGF-1 receptors analysed by using the two-hybrid system. *FEBS Lett.* 373: 51-55.
- Lawlor, M. A., Mora, A., Ashby, P. R., Williams, M. R., Murray-Tait, V., Malone, L., Prescott, A. R., Lucocq, J. M. & Alessi, D. R. 2002. Essential role of PDK1 in regulating cell size and development in mice. *EMBO J.* 21: 3728-3738.
- Le Roith, D., Bondy, C., Yakar, S., Liu, J. L. & Butler, A. 2001. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr.Rev.* 22: 53-74.
- Lee, Y. L., Hintz, R. L., James, P. M., Lee, P. D., Shively, J. E. & Powell, D. R. 1988. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein complementary deoxyribonucleic acid from human HEP G2 hepatoma cells: predicted protein sequence suggests an IGF binding domain different from those of the IGF-I and IGF-II receptors. *Mol.Endocrinol.* 2: 404-411.
- Leu, M., Ehler, E. & Perriard, J. C. 2001. Characterisation of postnatal growth of the murine heart. *Anat Embryol.(Berl)* 204: 217-224.
- Lewis, N. E. & Rossant, J. 1982. Mechanism of size regulation in mouse embryo aggregates. *J.Embryol.Exp.Morphol.* 72: 169-181.
- Lewitt, M. S., Denyer, G. S., Cooney, G. J. & Baxter, R. C. 1991. Insulin-like growth factor-binding protein-1 modulates blood glucose levels. *Endocrinology* 129: 2254-2256.
- Li, D. M. & Sun, H. 1997. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res.* 57: 2124-2129.
- Liebich, H.-G. 1993. Endokrines System. In Liebich, H.-G. (Ed) Funktionelle Histologie (pp. 136-151). Schattauer Verlag Stuttgart New York.

- Lippman, M. E., Dickson, R. B., Gelmann, E. P., Rosen, N., Knabbe, C., Bates, S., Bronzert, D., Huff, K. & Kasid, A. 1987. Growth regulation of human breast carcinoma occurs through regulated growth factor secretion. *J.Cell Biochem.* 35: 1-16.
- Liu, K. D., Gaffen, S. L. & Goldsmith, M. A. 1998. JAK/STAT signaling by cytokine receptors. *Curr.Opin.Immunol.* 10: 271-278.
- Lopaczynski, W., Harris, S. & Nissley, P. 1993. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) dependent phosphorylation of the IGF-I receptor in MG-63 cells. *Regul.Pept.* 48: 207-216.
- Lowe, W. L., Jr., Roberts, C. T., Jr., Lasky, S. R. & LeRoith, D. 1987. Differential expression of alternative 5' untranslated regions in mRNAs encoding rat insulin-like growth factor I. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84: 8946-8950.
- Ludwig, T., Eggenschwiler, J., Fisher, P., D'Ercole, A. J., Davenport, M. L. & Efstratiadis, A. 1996. Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in Igf2 and Igf1r null backgrounds. *Dev.Biol.* 177: 517-535.
- Luo, X., Ikeda, Y. & Parker, K. L. 1994. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77: 481-490.
- Lupu, F., Terwilliger, J. D., Lee, K., Segre, G. V. & Efstratiadis, A. 2001. Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. *Dev.Biol.* 229: 141-162.
- Maehama, T. & Dixon, J. E. 1998. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J.Biol.Chem.* 273: 13375-13378.
- Maekawa, M., Yamamoto, T., Tanoue, T., Yuasa, Y., Chisaka, O. & Nishida, E. 2005. Requirement of the MAP kinase signaling pathways for mouse preimplantation development. *Development* 132: 1773-1783.
- Martin, J. L., Ballesteros, M. & Baxter, R. C. 1992. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and transforming growth factor-beta 1 release IGF-binding protein-3 from human fibroblasts by different mechanisms. *Endocrinology* 131: 1703-1710.
- Martin, J. L. & Baxter, R. C. 1986. Insulin-like growth factor-binding protein from human plasma. Purification and characterization. *J.Biol.Chem.* 261: 8754-8760.
- Martin, K. A., Schalm, S. S., Richardson, C., Romanelli, A., Keon, K. L. & Blenis, J. 2001. Regulation of ribosomal S6 kinase 2 by effectors of the phosphoinositide 3-kinase pathway. *J.Biol.Chem.* 276: 7884-7891.
- Marzella, L. & Glaumann, H. 1983. Biogenesis, translocation, and function of lysosomal enzymes. *Int.Rev.Exp.Pathol.* 25: 239-278.
- Matsumoto, T., Gargosky, S. E., Oh, Y. & Rosenfeld, R. G. 1996. Transcriptional and post-translational regulation of insulin-like growth factor-binding protein-5 in rat articular chondrocytes. *J.Endocrinol.* 148: 355-369.
- Michalopoulos, G. K. & DeFrances, M. C. 1997. Liver regeneration. *Science* 276: 60-66.



- Miyata, Y. & Nishida, E. 1999. Distantly related cousins of MAP kinase: biochemical properties and possible physiological functions. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 266: 291-295.
- Mohan, S., Baylink, D. J. & Pettis, J. L. 1996. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins in serum--do they have additional roles besides modulating the endocrine IGF actions? *J.Clin.Endocrinol.Metab* 81: 3817-3820.
- Montagne, J., Stewart, M. J., Stocker, H., Hafen, E., Kozma, S. C. & Thomas, G. 1999. Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size. *Science* 285: 2126-2129.
- Moore, M. G., Wetterau, L. A., Francis, M. J., Peehl, D. M. & Cohen, P. 2003. Novel stimulatory role for insulin-like growth factor binding protein-2 in prostate cancer cells. *Int.J.Cancer* 105: 14-19.
- Moutoussamy, S., Renaudie, F., Lago, F., Kelly, P. A. & Finidori, J. 1998. Grb10 identified as a potential regulator of growth hormone (GH) signaling by cloning of GH receptor target proteins. *J.Biol.Chem.* 273: 15906-15912.
- Muggeo, M., Tiengo, A., Fedele, D. & Crepaldi, G. 1975. The influence of plasma triglycerides on human growth hormone response to arginine and insulin: a study in hyperlipemics and normal subjects. *Horm.Metab Res.* 7: 367-374.
- Myers, M. P., Stolarov, J. P., Eng, C., Li, J., Wang, S. I., Wigler, M. H., Parsons, R. & Tonks, N. K. 1997. P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94: 9052-9057.
- Neufeld, T. P., de la Cruz, A. F., Johnston, L. A. & Edgar, B. A. 1998. Coordination of growth and cell division in the Drosophila wing. *Cell* 93: 1183-1193.
- Nusse, R. 1997. A versatile transcriptional effector of Wingless signaling. *Cell* 89: 321-323.
- Oka, Y., Rozek, L. M. & Czech, M. P. 1985. Direct demonstration of rapid insulin-like growth factor II Receptor internalization and recycling in rat adipocytes. Insulin stimulates 125I-insulin-like growth factor II degradation by modulating the IGF-II receptor recycling process. *J.Biol.Chem.* 260: 9435-9442.
- Oldham, S., Montagne, J., Radimerski, T., Thomas, G. & Hafen, E. 2000. Genetic and biochemical characterization of dTOR, the Drosophila homolog of the target of rapamycin. *Genes Dev.* 14: 2689-2694.
- Paradis, S., Ailion, M., Toker, A., Thomas, J. H. & Ruvkun, G. 1999. A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* 13: 1438-1452.
- Parker, A., Rees, C., Clarke, J., Busby, W. H., Jr. & Clemmons, D. R. 1998. Binding of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-5 to smooth-muscle cell extracellular matrix is a major determinant of the cellular response to IGF-I. *Mol.Biol.Cell* 9: 2383-2392.
- Pereira, J. J., Meyer, T., Docherty, S. E., Reid, H. H., Marshall, J., Thompson, E. W., Rossjohn, J. & Price, J. T. 2004. Bimolecular interaction of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-2 with alphavbeta3 negatively modulates IGF-I-mediated migration and tumor growth. *Cancer Res.* 64: 977-984.

- Perren, A., Komminoth, P., Saremaslani, P., Matter, C., Feurer, S., Lees, J. A., Heitz, P. U. & Eng, C. 2000. Mutation and expression analyses reveal differential subcellular compartmentalization of PTEN in endocrine pancreatic tumors compared to normal islet cells. *Am.J.Pathol.* 157: 1097-1103.
- Pintar, J. E., Schuller, A., Cerro, J. A., Czick, M., Grewal, A. & Green, B. 1995. Genetic ablation of IGFBP-2 suggests functional redundancy in the IGFBP family. *Prog.Growth Factor Res.* 6: 437-445.
- Politi, K., Szabolcs, M., Fisher, P., Kljuic, A., Ludwig, T. & Efstratiadis, A. 2004. A mouse model of uterine leiomyosarcoma. *Am.J.Pathol.* 164: 325-336.
- Polychronakos, C. 1993. Parental imprinting of the genes for IGF-II and its receptor. *Adv.Exp.Med.Biol.* 343: 189-203.
- Posner, B. I., Kelly, P. A., Shiu, R. P. & Friesen, H. G. 1974. Studies of insulin, growth hormone and prolactin binding: tissue distribution, species variation and characterization. *Endocrinology* 95: 521-531.
- Potter, C. J. & Xu, T. 2001. Mechanisms of size control. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 11: 279-286.
- Powell-Braxton, L., Hollingshead, P., Warburton, C., Dowd, M., Pitts-Meek, S., Dalton, D., Gillett, N. & Stewart, T. A. 1993. IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes Dev.* 7: 2609-2617.
- Prout, T. & Barker, J. S. 1989. Ecological aspects of the heritability of body size in *Drosophila buzzatii*. *Genetics* 123: 803-813.
- Puertollano, R., Aguilar, R. C., Gorshkova, I., Crouch, R. J. & Bonifacino, J. S. 2001. Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs. *Science* 292: 1712-1716.
- Raff, M. C. 1996. Size control: the regulation of cell numbers in animal development. *Cell* 86: 173-175.
- Rajeevan, M. S., Ranamukhaarachchi, D. G., Vernon, S. D. & Unger, E. R. 2001. Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods* 25: 443-451.
- Rajkumar, K., Barron, D., Lewitt, M. S. & Murphy, L. J. 1995. Growth retardation and hyperglycemia in insulin-like growth factor binding protein-1 transgenic mice. *Endocrinology* 136: 4029-4034.
- Ramirez, M. T., Sah, V. P., Zhao, X. L., Hunter, J. J., Chien, K. R. & Brown, J. H. 1997. The MEKK-JNK pathway is stimulated by alpha1-adrenergic receptor and ras activation and is associated with in vitro and in vivo cardiac hypertrophy. *J.Biol.Chem.* 272: 14057-14061.
- Rinderknecht, E. & Humbel, R. E. 1978. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J.Biol.Chem.* 253: 2769-2776.
- Rosenzweig, S. A. 2004. What's new in the IGF-binding proteins? *Growth Horm.IGF.Res.* 14: 329-336.

- Russo, V. C., Bach, L. A., Fosang, A. J., Baker, N. L. & Werther, G. A. 1997. Insulin-like growth factor binding protein-2 binds to cell surface proteoglycans in the rat brain olfactory bulb. *Endocrinology* 138: 4858-4867.
- Salih, D. A., Tripathi, G., Holding, C., Szeszak, T. A., Gonzalez, M. I., Carter, E. J., Cobb, L. J., Eisemann, J. E. & Pell, J. M. 2004. Insulin-like growth factor-binding protein 5 (Igfbp5) compromises survival, growth, muscle development, and fertility in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101: 4314-4319.
- Salmon, W. D., Jr. & Daughaday, W. H. 1990. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. 1956. *J.Lab Clin.Med.* 116: 408-419.
- Sasaoka, T., Rose, D. W., Jhun, B. H., Saltiel, A. R., Draznin, B. & Olefsky, J. M. 1994. Evidence for a functional role of Shc proteins in mitogenic signaling induced by insulin, insulin-like growth factor-1, and epidermal growth factor. *J.Biol.Chem.* 269: 13689-13694.
- Sato, T. 1967. Age and sex differences in the fine structure of the mouse adrenal cortex. *Nagoya J.Med.Sci.* 30: 225-251.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. & Brown, P. O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470.
- Schmucker, D. L., Mooney, J. S. & Jones, A. L. 1978. Stereological analysis of hepatic fine structure in the Fischer 344 rat. Influence of sublobular location and animal age. *J.Cell Biol.* 78: 319-337.
- Schuller, A. G., Zwarthoff, E. C. & Drop, S. L. 1993. Gene expression of the six insulin-like growth factor binding proteins in the mouse conceptus during mid- and late gestation. *Endocrinology* 132: 2544-2550.
- Schutt, B. S., Langkamp, M., Rauschnabel, U., Ranke, M. B. & Elmlinger, M. W. 2004. Integrin-mediated action of insulin-like growth factor binding protein-2 in tumor cells. *J.Mol.Endocrinol.* 32: 859-868.
- Shima, H., Pende, M., Chen, Y., Fumagalli, S., Thomas, G. & Kozma, S. C. 1998. Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *EMBO J.* 17: 6649-6659.
- Shioi, T., Kang, P. M., Douglas, P. S., Hampe, J., Yballe, C. M., Lawitts, J., Cantley, L. C. & Izumo, S. 2000. The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J.* 19: 2537-2548.
- Shioi, T., McMullen, J. R., Kang, P. M., Douglas, P. S., Obata, T., Franke, T. F., Cantley, L. C. & Izumo, S. 2002. Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Mol.Cell Biol.* 22: 2799-2809.
- Silha, J. V. & Murphy, L. J. 2002. Insights from insulin-like growth factor binding protein transgenic mice. *Endocrinology* 143: 3711-3714.
- Song, S. W., Fuller, G. N., Khan, A., Kong, S., Shen, W., Taylor, E., Ramdas, L., Lang, F. F. & Zhang, W. 2003. Iip45, an insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) binding protein, antagonizes IGFBP-2 stimulation of glioma cell invasion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100: 13970-13975.

Sotiropoulos, A., Moutoussamy, S., Renaudie, F., Clauss, M., Kayser, C., Gouilleux, F., Kelly, P. A. & Finidori, J. 1996. Differential activation of Stat3 and Stat5 by distinct regions of the growth hormone receptor. *Mol.Endocrinol.* 10: 998-1009.

Spencer, E. M. & Chan, K. 1995. A 3-dimensional model for the insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs); supporting evidence using the structural determinants of the IGF binding site on IGFBP-3. *Prog.Growth Factor Res.* 6: 209-214.

Spiess, J., Rivier, J. & Vale, W. 1983. Characterization of rat hypothalamic growth hormone-releasing factor. *Nature* 303: 532-535.

Starr, R. & Hilton, D. J. 1999. Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *Bioessays* 21: 47-52.

Steele-Perkins, G., Turner, J., Edman, J. C., Hari, J., Pierce, S. B., Stover, C., Rutter, W. J. & Roth, R. A. 1988. Expression and characterization of a functional human insulin-like growth factor I receptor. *J.Biol.Chem.* 263: 11486-11492.

Sterio, D. C. 1984. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J.Microsc.* 134 ( Pt 2): 127-136.

Stewart, M. J. & Thomas, G. 1994. Mitogenesis and protein synthesis: a role for ribosomal protein S6 phosphorylation? *Bioessays* 16: 809-815.

Stoger, R., Kubicka, P., Liu, C. G., Kafri, T., Razin, A., Cedar, H. & Barlow, D. P. 1993. Maternal-specific methylation of the imprinted mouse *Igf2r* locus identifies the expressed locus as carrying the imprinting signal. *Cell* 73: 61-71.

Su, T. T. & O'Farrell, P. H. 1998. Size control: cell proliferation does not equal growth. *Curr.Biol.* 8: R687-R689.

Sun, X. J., Wang, L. M., Zhang, Y., Yenush, L., Myers, M. G., Jr., Glasheen, E., Lane, W. S., Pierce, J. H. & White, M. F. 1995. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 377: 173-177.

Swinyard CA 1939. Methods for volumetric determination of fresh endocrine glands. *Anat Rec* 74: 71-78.

Takaya, K., Ariyasu, H., Kanamoto, N., Iwakura, H., Yoshimoto, A., Harada, M., Mori, K., Komatsu, Y., Usui, T., Shimatsu, A., Ogawa, Y., Hosoda, K., Akamizu, T., Kojima, M., Kangawa, K. & Nakao, K. 2000. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 85: 4908-4911.

Tamemoto, H., Kadowaki, T., Tobe, K., Yagi, T., Sakura, H., Hayakawa, T., Terauchi, Y., Ueki, K., Kaburagi, Y., Satoh, S. & . 1994. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372: 182-186.

Tamura, M., Gu, J., Danen, E. H., Takino, T., Miyamoto, S. & Yamada, K. M. 1999. PTEN interactions with focal adhesion kinase and suppression of the extracellular matrix-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J.Biol.Chem.* 274: 20693-20703.

- Tamura, M., Gu, J., Matsumoto, K., Aota, S., Parsons, R. & Yamada, K. M. 1998. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 280: 1614-1617.
- Tian, X., Rusanescu, G., Hou, W., Schaffhausen, B. & Feig, L. A. 2002. PDK1 mediates growth factor-induced Ral-GEF activation by a kinase-independent mechanism. *EMBO J.* 21: 1327-1338.
- Toker, A. & Newton, A. C. 2000. Cellular signaling: pivoting around PDK-1. *Cell* 103: 185-188.
- Trejo, J. L., Carro, E., Lopez-Lopez, C. & Torres-Aleman, I. 2004. Role of serum insulin-like growth factor I in mammalian brain aging. *Growth Horm.IGF.Res.* 14 Suppl A: S39-S43.
- Tuttle, R. L., Gill, N. S., Pugh, W., Lee, J. P., Koeberlein, B., Furth, E. E., Polonsky, K. S., Naji, A. & Birnbaum, M. J. 2001. Regulation of pancreatic beta-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKBalpha. *Nat.Med.* 7: 1133-1137.
- Twigg, S. M., Kiefer, M. C., Zapf, J. & Baxter, R. C. 1998. Insulin-like growth factor-binding protein 5 complexes with the acid-labile subunit. Role of the carboxyl-terminal domain. *J.Biol.Chem.* 273: 28791-28798.
- Valentinis, B. & Baserga, R. 2001. IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation. *Mol.Pathol.* 54: 133-137.
- VanderKuur, J., Allevato, G., Billestrup, N., Norstedt, G. & Carter-Su, C. 1995. Growth hormone-promoted tyrosyl phosphorylation of SHC proteins and SHC association with Grb2. *J.Biol.Chem.* 270: 7587-7593.
- Verdu, J., Buratovich, M. A., Wilder, E. L. & Birnbaum, M. J. 1999. Cell-autonomous regulation of cell and organ growth in Drosophila by Akt/PKB. *Nat.Cell Biol.* 1: 500-506.
- Volarevic, S. & Thomas, G. 2001. Role of S6 phosphorylation and S6 kinase in cell growth. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.* 65: 101-127.
- Vyas, D. R., Spangenburg, E. E., Abraha, T. W., Childs, T. E. & Booth, F. W. 2002. GSK-3beta negatively regulates skeletal myotube hypertrophy. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 283: C545-C551.
- Wallenius, K., Sjogren, K., Peng, X. D., Park, S., Wallenius, V., Liu, J. L., Umaerus, M., Wennbo, H., Isaksson, O., Frohman, L., Kineman, R., Ohlsson, C. & Jansson, J. O. 2001. Liver-derived IGF-I regulates GH secretion at the pituitary level in mice. *Endocrinology* 142: 4762-4770.
- Wang, H., Wang, H., Shen, W., Huang, H., Hu, L., Ramdas, L., Zhou, Y. H., Liao, W. S., Fuller, G. N. & Zhang, W. 2003. Insulin-like growth factor binding protein 2 enhances glioblastoma invasion by activating invasion-enhancing genes. *Cancer Res.* 63: 4315-4321.
- Wang, J., Niu, W., Witte, D. P., Chernausk, S. D., Nikiforov, Y. E., Clemens, T. L., Sharifi, B., Strauch, A. R. & Fagin, J. A. 1998. Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-4 (IGFBP-4) in smooth muscle cells of transgenic mice through a smooth muscle alpha-actin-IGFBP-4 fusion gene induces smooth muscle hypoplasia. *Endocrinology* 139: 2605-2614.

- Wang, Y. D., Wong, K. & Wood, W. I. 1995. Intracellular tyrosine residues of the human growth hormone receptor are not required for the signaling of proliferation or Jak-STAT activation. *J.Biol.Chem.* 270: 7021-7024.
- Wang, Z. Q., Fung, M. R., Barlow, D. P. & Wagner, E. F. 1994b. Regulation of embryonic growth and lysosomal targeting by the imprinted Igf2/Mpr gene. *Nature* 372: 464-467.
- Wang, Z. Q., Fung, M. R., Barlow, D. P. & Wagner, E. F. 1994a. Regulation of embryonic growth and lysosomal targeting by the imprinted Igf2/Mpr gene. *Nature* 372: 464-467.
- Wanke, R., Hermanns, W., Folger, S., Wolf, E. & Brem, G. 1991. Accelerated growth and visceral lesions in transgenic mice expressing foreign genes of the growth hormone family: an overview. *Pediatr.Nephrol.* 5: 513-521.
- Waters, M. J., Shang, C. A., Behncken, S. N., Tam, S. P., Li, H., Shen, B. & Lobie, P. E. 1999. Growth hormone as a cytokine. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 26: 760-764.
- Weber, M. M., Fottner, C., Schmidt, P., Brodowski, K. M., Gittner, K., Lahm, H., Engelhardt, D. & Wolf, E. 1999. Postnatal overexpression of insulin-like growth factor II in transgenic mice is associated with adrenocortical hyperplasia and enhanced steroidogenesis. *Endocrinology* 140: 1537-1543.
- Weinkove, D., Neufeld, T. P., Twardzik, T., Waterfield, M. D. & Leever, S. J. 1999. Regulation of imaginal disc cell size, cell number and organ size by Drosophila class I(A) phosphoinositide 3-kinase and its adaptor. *Curr.Biol.* 9: 1019-1029.
- Welsh, G. I., Wilson, C. & Proud, C. G. 1996. GSK3: a SHAGGY frog story. *Trends Cell Biol.* 6: 274-279.
- Weng, L. P., Brown, J. L., Baker, K. M., Ostrowski, M. C. & Eng, C. 2002. PTEN blocks insulin-mediated ETS-2 phosphorylation through MAP kinase, independently of the phosphoinositide 3-kinase pathway. *Hum.Mol.Genet.* 11: 1687-1696.
- Wilden, P. A., Treadway, J. L., Morrison, B. D. & Pessin, J. E. 1989. IGF-1-dependent subunit communication of the IGF-1 holoreceptor: interactions between alpha beta heterodimeric receptor halves. *Biochemistry* 28: 9734-9740.
- Williams, A. C., Collard, T. J., Perks, C. M., Newcomb, P., Moorghen, M., Holly, J. M. & Paraskeva, C. 2000. Increased p53-dependent apoptosis by the insulin-like growth factor binding protein IGFBP-3 in human colonic adenoma-derived cells. *Cancer Res.* 60: 22-27.
- Wilson, C. 1994. Receptor tyrosine kinase signalling: not so complex after all? *Trends Cell Biol.* 4: 409-414.
- Wolf, E., Lahm, H., Wu, M., Wanke, R. & Hoeflich, A. 2000. Effects of IGFBP-2 overexpression in vitro and in vivo. *Pediatr.Nephrol.* 14: 572-578.
- Wood, T. L., Rogler, L., Streck, R. D., Cerro, J., Green, B., Grewal, A. & Pintar, J. E. 1993. Targeted disruption of IGFBP-2 gene. *Growth Regul.* 3: 5-8.
- Woodgett, J. R., Plyte, S. E., Pulverer, B. J., Mitchell, J. A. & Hughes, K. 1993. Roles of glycogen synthase kinase-3 in signal transduction. *Biochem.Soc.Trans.* 21: 905-907.

- Wylie, A. A., Pulford, D. J., McVie-Wylie, A. J., Waterland, R. A., Evans, H. K., Chen, Y. T., Nolan, C. M., Orton, T. C. & Jirtle, R. L. 2003. Tissue-specific inactivation of murine M6P/IGF2R. *Am.J.Pathol.* 162: 321-328.
- Xu, T. & Rubin, G. M. 1993. Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* 117: 1223-1237.
- Yakar, S., Liu, J. L., Stannard, B., Butler, A., Accili, D., Sauer, B. & LeRoith, D. 1999. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96: 7324-7329.
- Yamauchi, T., Kaburagi, Y., Ueki, K., Tsuji, Y., Stark, G. R., Kerr, I. M., Tsushima, T., Akanuma, Y., Komuro, I., Tobe, K., Yazaki, Y. & Kadowaki, T. 1998. Growth hormone and prolactin stimulate tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1, -2, and -3, their association with p85 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase), and concomitantly PI3-kinase activation via JAK2 kinase. *J.Biol.Chem.* 273: 15719-15726.
- Yamauchi, T., Ueki, K., Tobe, K., Tamemoto, H., Sekine, N., Wada, M., Honjo, M., Takahashi, M., Takahashi, T., Hirai, H., Tushima, T., Akanuma, Y., Fujita, T., Komuro, I., Yazaki, Y. & Kadowaki, T. 1997. Tyrosine phosphorylation of the EGF receptor by the kinase Jak2 is induced by growth hormone. *Nature* 390: 91-96.
- Yang, G. P., Ross, D. T., Kuang, W. W., Brown, P. O. & Weigel, R. J. 1999. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res.* 27: 1517-1523.
- Zadeh, S. M. & Binoux, M. 1997. The 16-kDa proteolytic fragment of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 inhibits the mitogenic action of fibroblast growth factor on mouse fibroblasts with a targeted disruption of the type 1 IGF receptor gene. *Endocrinology* 138: 3069-3072.
- Zhang, M., Faugere, M. C., Malluche, H., Rosen, C. J., Chernausek, S. D. & Clemens, T. L. 2003. Paracrine overexpression of IGFBP-4 in osteoblasts of transgenic mice decreases bone turnover and causes global growth retardation. *J.Bone Miner.Res.* 18: 836-843.
- Zhang, Y., Jiang, J., Kopchick, J. J. & Frank, S. J. 1999. Disulfide linkage of growth hormone (GH) receptors (GHR) reflects GH-induced GHR dimerization. Association of JAK2 with the GHR is enhanced by receptor dimerization. *J.Biol.Chem.* 274: 33072-33084.
- Zhou, Y., Xu, B. C., Maheshwari, H. G., He, L., Reed, M., Lozykowski, M., Okada, S., Cataldo, L., Coschigamo, K., Wagner, T. E., Baumann, G. & Kopchick, J. J. 1997. A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94: 13215-13220.
- Zhu, T., Goh, E. L., Graichen, R., Ling, L. & Lobie, P. E. 2001a. Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cell Signal.* 13: 599-616.
- Zhu, Y., Doray, B., Poussu, A., Lehto, V. P. & Kornfeld, S. 2001b. Binding of GGA2 to the lysosomal enzyme sorting motif of the mannose 6-phosphate receptor. *Science* 292: 1716-1718.

## 12 Danksagung

Am Ende meiner Arbeit möchte ich mich herzlich bei den Menschen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht gelungen wäre:

Herrn Prof. Dr. med. vet. E. Wolf für die Vermittlung der Dissertation und die stets freundliche und hilfreiche Unterstützung, sowie die zugängliche statistische Auswertung.

Herrn Priv. Doz. Dr. rer. nat. A. Höflich für die Überlassung des Themas, die Betreuung meiner Arbeit, für die Überlassung von Ergebnissen aus der Signaltransduktion und die Hilfe bei der statistischen und graphischen Bearbeitung der Versuchsergebnisse. Und auch die tolle Erfahrung down under, die ich dank seines Einsatzes machen durfte.

Herrn Dr. rer. nat. Stefan Bauersachs für die exzellente Betreuung, die immer hilfreichen Erklärungen und das stets offene Ohr für Fragen.

Herrn Dr. rer. nat. Helmut Blum für die freundliche Aufnahme in seinem Labor und die vielen hilfreichen Tipps. Und nicht zuletzt eine tolle Herausforderung für die Zukunft, die mir immer wieder Motivation in den mühsamen Stunden des Zusammenschreibens gegeben hat.

Herrn Prof. Dr. med. vet. R. Wanke für die Nutzung der Geräte und Arbeitskräfte seines Institutes. Und seine große Geduld bei stereologischen Erklärungen.

Herrn Dr. med. vet. Marc Boelhauve für die hilfreiche Unterstützung vor allem bei der Durchführung der qPCR, aber auch bei allen anderen kleinen und großen Problemen im Labor.

Herrn Dr. med. vet T. Fisch, der zu Beginn meiner Doktorarbeit noch Doktorand am Institut für Tierpathologie war. Er war immer mit Rat und Tat zur Seite bei allen Arbeitsschritten, die an der Maus und ihrer Nebenniere nötig waren. Er führte mich in die Grundlagen des Mäusehandlings, der Organpräparation und auch der stereologischen Untersuchung ein. Außerdem bildete seine hervorragende Arbeit die Grundlage meiner Dissertation.

Frau Dr. med. vet. N. Herbach und Herrn Dr. med. vet. D. Rauleder für die Unterstützung und Hilfe bei allen Arbeiten, die ich am Institut für Tierpathologie durchgeführt habe.

Frau Susanne Rehfeld, die mich freundschaftlich durch meine Doktorarbeit begleitet hat, mit der ich alle Sorgen und viele gemeinsame Labor und Stallnächte teilen konnte. Sie hat durch



ihre Engelsgeduld die Ausführung dieser Doktorarbeit erst möglich gemacht, denn sie hatte stets ein offenes Ohr für mich, wenn ich Fragen zur Bedienung von Computer-Software hatte.

Herrn Andreas Blutke für die Anleitung bei der Perfusionsfixation der Mäuse und seine hervorragende bildliche Darstellung.

Frau S. Mallok und Frau P. Demleitner für die Einführung in Laborarbeitstechniken, die stete Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Frau L. Pichl, Frau N. Böhmert, Frau Siebert und Herrn F. Martin, Mitarbeiter- / innen der Tierpathologie, die immer tatkräftig zur Seite standen und mich auch durch die Ausführung der histologischen Vorarbeiten tatkräftig unterstützten.

Und natürlich auch den Mitarbeitern des Tierstalls am Institut für molekulare Tierzucht und am Institut für Tierpathologie für die Betreuung der Tiere.

Nicht zu vergessen bei meinen Mäusen, die den Hauptbeitrag geleistet haben.

Allen Kolleginnen und Kollegen, viele von ihnen mittlerweile gute Freunde aus dem Institut für molekulare Tierzucht. Sie haben mich in der Zeit meiner Dissertation immer mit Rat und Tat begleitet, bei Problemen unterstützt, stets ein offenes Ohr gehabt und auch in aussichtslos scheinenden Situationen dafür gesorgt, dass mich der Mut nicht verlassen hat.

Abschließend möchte ich noch all meinen FreundInnen und Bekannten danken, die immer an mich und das Gelingen dieser Dissertation geglaubt haben und mich mit allen Mitteln unterstützt haben.

Zu diesen gehören an allererster Stelle meine Eltern und mein Freund Andreas. Diesen wichtigsten Menschen in meinem Leben möchte ich die vorliegende Arbeit widmen.

### 13 Lebenslauf

**Name:** Susanne Eva Maria Schmidt

**persönliche Daten:**

Geburtsdatum: 03.09.1975

Geburtsort: München

Familienstand: Ledig

Staatsangehörigkeit: Deutsch

**Eltern:** Christiana Schmidt, geb. Wirth,  
Klaus Schmidt

**Geschwister:** Christoph Schmidt

**Schule:**

1982 bis 1986 Volksschule in Wörthsee

1986 bis 1994 Gymnasium in Gilching,

1994 bis 1996 Carl Spitzweg Gymnasium in Germering

Juli 1996 Abitur

**Studium:**

WS 1996 bis SS 2002 Tiermedizin-Studium an der LMU München

Abschluss: Staatsexamen

13. Sep 2002 Approbation

**Promotion:**

Seit 15.10.2002 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für molekulare  
Tierzucht der LMU München

Seit 01.01.2004 Wissenschaftliche Angestellte am Institut für molekulare  
Tierzucht der LMU München

**Tiermedizinische Praktika:**

Landwirtschaftliches Praktikum im LVG Oberschleißheim,

Praktikum in der chirurgischen Kleintierklinik Dr. Röcken,

Praktikum in der I. med. Tierklinik Abt. Kleintiere der LMU,

Praktikum am Schlachthof Neuss und Krefeld,

Praktikum am pathologischen Institut der veterinärmedizinischen Fakultät der LMU,

Praktikum am mikrobiologischen Institut der veterinärmedizinischen Fakultät der LMU,

Seminar in der BFA in Tübingen